



TITLE:

Ras/MARK経路の活性化による Fasを介するアポトーシスの調節機 構の解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

風間, 啓敬

CITATION:

風間, 啓敬. Ras/MARK経路の活性化によるFasを介するアポトーシスの調節機構の解析. 京都大学, 2000, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2000-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3167156>

RIGHT:

主論文

②

Ras/MAPK 経路の活性化による Fas を介する アポトーシス調節機構の解析

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻

風 間 啓 敬

Ras/MAPK 経路の活性化による Fas を介するアポトーシス

調節機構の解析

要旨

マウス繊維芽細胞 Balb3T3 に Fas を安定に発現させた細胞株 (FH2) を用いて Fas を介するアポトーシスを抑制する遺伝子の発現クローニングを行い、その結果、原癌遺伝子である c-k-ras がクローニングされた。Ras の変異体を用いた実験から、活性型 Ras (RasV12) が Fas を介するアポトーシスを強く抑制し、逆に優勢阻害変異型 Ras (RasN17) がアポトーシスを促進することがわかった。さらに、Fas 刺激による Caspase の活性化も RasV12 の発現によって抑制されることがわかった。Raf、PI-3 キナーゼ、RalGDS などが Ras のターゲット分子として知られているが、FH2 細胞においては PI-3 キナーゼや RalGDS によるシグナル伝達経路は Fas を介するアポトーシス誘導に影響を与えなかった。一方、活性型 Raf (Raf-CAAX) および活性型 MAPKK (SDSE-MAPKK) を強制発現させることによって、Fas を介するアポトーシスが抑制されることがわかった。これらの分子はともに MAPK のリン酸化による活性化を誘導するが、MAPK を特異的に脱リン酸化して不活性化するフォスファターゼ MKP-1 を発現させることによって、RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK によるアポトーシス抑制効果を無効にできることが明らかとなった。これらの結果は、Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制には MAPK の活性化が必須であることを示している。さらに、増殖因子である bFGF 処理によって、Ras/MAPK 経路を活性化しても、Fas を介するアポトーシスが抑制された。このことから、生理的な Ras の活性化でも十分 Fas を介するアポトーシスが抑制されることがわかった。以上のことから、Fas を介するアポトーシスは生理的な Ras/MAPK 経路の活性化により抑制され、細胞が癌化する段階でおこるアポトーシスを Ras が抑制することは癌発生的一端をになっていることが示唆された。

Ras/MAPK 経路の活性化による Fas を介するアポトーシス

調節機構の解析

目次

第 1 章 序論

- 1-1 アポトーシスとは
- 1-2 アポトーシス研究における基礎（線虫における遺伝学的解析）
- 1-3 Caspase ファミリー
- 1-4 イニシエーター Caspase の活性化
- 1-5 アポトーシスを抑制する機構
- 1-6 アポトーシスを誘導する刺激
- 1-7 アポトーシスを抑制するシグナル伝達経路
- 1-8 Ras による Fas を介するアポトーシスの調節

第 2 章 材料と方法

第 3 章 結果

- 3-1 Fas を介するアポトーシスを阻害する遺伝子としての c-K-ras の発現クローニング
- 3-2 活性型 Ras が Fas を介するアポトーシスを抑制する
- 3-3 活性型 K-Ras は Caspase を阻害する
- 3-4 MAPK の活性化が Fas を介するアポトーシスを抑制する
- 3-5 bFGF 前処理による Fas を介するアポトーシスの抑制

- 3-6 bFGF による Fas を介するアポトーシスの抑制も Ras/MAPK の活性化を必要とする
- 3-7 bFGF 刺激では内因性 Fas の発現はかわらない
- 3-8 c-FLIP による Fas を介するアポトーシスの制御
- 3-9 ヒト癌細胞由来細胞株における Ras の効果

第 4 章 考察

謝辞

参考文献

第 1 章 序論

1-1 アポトーシスとは

アポトーシス (Apoptosis) とは、電子顕微鏡観察による細胞内の特徴的な形態変化を伴った細胞死のことで、細胞内小胞器官の形態は維持されたまま、細胞核の断片化、クロマチンの核膜周辺への凝縮、アポトーシス小体とよばれる細胞膜の縮小断片化、細胞膜表面の平滑化、といった特徴がみられる (図 1-1)。生化学的には、Caspase と呼ばれるプロテアーゼの活性化や染色体がヌクレオソーム単位 (およそ 180 塩基対の整数倍) で切断されることによる DNA ラダーの観察によって特徴づけられる。細胞は、アポトーシスによって死んでいくための遺伝子を具備しており、発生分化、加齢や免疫防御の過程でそのスイッチを自らオンにし、自殺への道を辿ることができる。このような細胞死は、発生学的あるいは免疫学的にはプログラムされた細胞死 (Programmed cell death) とも呼ばれ、正常な発生や生体における恒常性の維持に必須な現象である。アポトーシスの障害が自己免疫疾患や癌などの症状を引き起こし、逆に不必要なアポトーシスの誘導が神経変性疾患やエイズなどに見られるような免疫不全症を引き起こすことがわかっている (図 1-2)。高等生物の生体内では、アポトーシスで死んだ細胞の断片 (アポトーシス小体) はマクロファージを主とした貪食細胞によって速やかに貪食消化される (図 1-1)。以上に述べたアポトーシスに見られる特徴と対象をなす細胞死として偶発的な細胞死であるネクローシス (necrosis) が定義される (図 1-1)。ネクローシスは、急熱、細胞膜の破壊や毒素といった外的要因によって引き起こされ、細胞内小胞器官や細胞自身の膨潤破裂および細胞質の漏出が観察される。その結果として生体においては、炎症を伴った免疫反応が誘導される。一方、アポトーシスにおいては炎症を伴わずに細胞が除去されるが、この点においてもネクローシスとは対照的であり、アポトーシスが生理的に重要な役割を担っているといえる。

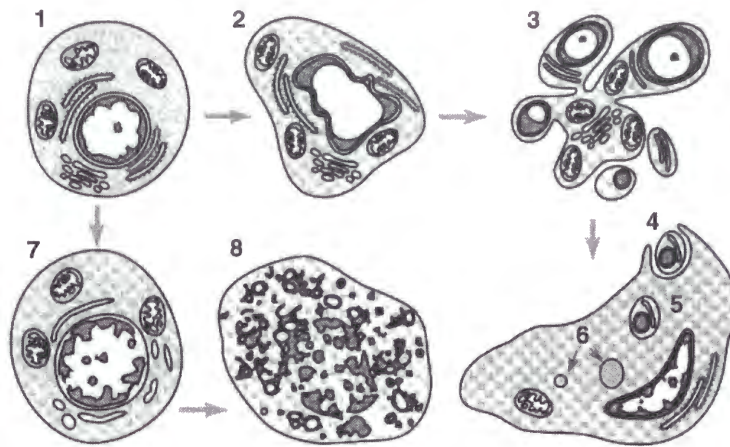


図1-1 アポトーシスとネクローシスの細胞の形態変化

1) 正常細胞。2～6) アポトーシスにおける細胞の形態変化：2) 細胞縮小とクロマチンの核膜周辺への凝縮。3) アポトーシス小体の形成。4～6) 近隣細胞による貪食。7・8) ネクローシスにおける細胞の形態変化：7) 細胞とミトコンドリアの膨潤。8) 細胞融解 実験医学別冊用語ライブラリーアポトーシスより引用した。

アポトーシスの阻害による

- 1、癌
 - 濾胞性リンパ種 (Follicular lymphomas)
 - p53変異による癌腫 (Carcinomas)
 - ホルモン依存性癌＝乳癌、前立腺癌、卵巣癌
- 2、自己免疫疾患
 - 全身性エリテマトーデス (=SLE、Systemic lupus erythematosus)
 - 免疫性糸球体腎炎 (=Immune-mediated glomerulonephritis)
- 3、ウイルス感染
 - ヘルペスウイルス (Herpesviruses)
 - ポックスウイルス (Poxviruses)
 - アデノウイルス (Adenoviruses)

アポトーシスの促進による

- 1、AIDS
- 2、神経変性疾患
 - アルツハイマー病 (=Alzheimer's disease)
 - パーキンソン病 (=Parkinson's disease)
 - 筋萎縮性側索硬化症(=ALS、Amyotrophic lateral sclerosis)
 - 小脳退化 (=Cerebellar degeneration)
- 3、骨髄異形成症候群 (=MDS、Myelodysplastic syndromes)
 - 再生不良性貧血 (Aplastic anemia)
- 4、虚血傷害
 - 心筋梗塞 (=Myocardial infarction)
 - 拍動 (=Stroke)
 - 血液再灌流(=Reperfusion injury)
- 5、毒物による肝障害 (アルコール等)

図1-2 アポトーシスの異常が原因となる病気

1-2 アポトーシス研究における基礎（線虫における遺伝学的解析）

アポトーシスの分子レベルでの研究の基礎は、線虫(*C. elegans*)を用いた遺伝学的解析によって築かれた。線虫は、雌雄同体（hermaphrodite）であるため、遺伝学的解析が可能で、さらに体が半透明のため発生段階での細胞の分化の系統を直接観察して追いかけることができた。雌雄同体の線虫では、1090 個の体細胞が作られるが、そのうち 131 個の細胞が死ぬようプログラムされている。Horvitz らのグループは、131 個の死ぬべき細胞が死ななかつたり死んだ後でも周辺細胞に食食消化されない変異を見つけたし遺伝学的に系統立て、アポトーシスにみられる生体内での一連の進行機構の概念を確立した（図 1-3）（Ellis, R. E., J. Yuan, R. H. Horvitz, *Annul. Rev. Cell Biol.*, 1991）。アポトーシスの実行段階に関わっている遺伝子は *ced-3*、4、9 および *egl-1* であることが示され、これらの遺伝子に変異がおきると死ぬべき全ての細胞が生き残ることから、アポトーシス実行の中心的役割をこれらの遺伝子が果たしていることがわかった。その後の遺伝子のクローニングによって CED-3 はシステインを活性中心にもつプロテアーゼ、CED-4 は CED-3 と結合し自身と結合して多量体化することで CED-3 を活性化する分子、さらに CED-9 は CED-4 と結合し CED-3 が活性化するのを抑制している分子であり、最初に得られた細胞が死なない表現型を示した *ced-9* の *C.elegans* 変異株は Gain-of-function 変異であることがわかった。さらに、EGL-1 は構造的に Bcl-2 ファミリー内で保存された BH3 ドメインのみからなる分子であることがわかった。生化学的には、CED-3、4、9 の三分子が結合し合いアポプトソームと呼ばれる複合体を形成していることが示されており、そこに EGL-1 が加わると CED-9 に結合し CED-4 と CED-3 の複合体がアポプトソームから解離し、CED-3 が活性化されると考えられている。これらの分子はそれぞれの遺伝子が哺乳類を含む脊椎動物において保存されていることから、アポトーシスという機構のもつ重要性を示している。さらに、線虫の遺伝学的解

析から特定の細胞においては、アポトーシスの実行を調整する遺伝子の存在も示されている（図 1-3）。CES-1 は EGL-1 の発現を抑制するタンパクであり、さらに CES-1 の発現は CES-2 によって抑えられる。つまり、特定の神経細胞での CES-2 の発現は、EGL-1 の発現を誘導しアポトーシスへとつながる。CES-1 は Snail ファミリーに属す zinc フィンガータンパクで、CES-2 は PAR ファミリーに属す bZIP 転写因子である。

線虫ではアポトーシスで死んだ細胞は、周辺細胞に貪食される。その段階に関わっている遺伝子が *ced-1, 2, 5, 6, 7, 8, 10* である。これまでに *ced-5, 6, 7* の遺伝子がクローニングされ、それぞれ DOCK180、hCED-6、ABC1 と相同性をもつタンパクをコードしていることがわかっている。DOCK180 は CrkII-DOCK180-Rac シグナル経路に関わり、細胞骨格の再構成を行う。hCED-6 はアダプタータンパクで、高発現によってアポトーシス細胞の貪食効率が上がるが、詳しい解析はこれからおこなわれると予想される。ABC1 は ABC トランスポーターであり、細胞膜間輸送に関わっている。

1-3 Caspase ファミリー

ced-3 のクローニングから、システインプロテアーゼがアポトーシスで重要な役割を担っていることが示されて以降、ヒトやマウスで *ced-3* と相同性の高いシステインプロテアーゼがいくつもクローニングされた。これらのプロテアーゼは、活性中心のシステインを挟んで QACRG の保存された配列をもち、基質となるタンパクのアスパラギン酸（asp）のカルボキシル末端側を切断する protease であることから、機能的特徴にちなんで **Caspase** と名付けられた (Thornberry and Lazebnik, 1998)。現在までのところ、Caspase-14 までクローニングされているが、Caspase-4 ならびに-5 はヒトの Caspase で、マウスではそれぞれ Caspase-11 と-12 に相当すると考えられている（図 1-4） (Van de Craen et al., 1997)。Caspase は Zymogen として一つのペプチドとして合成される。その構

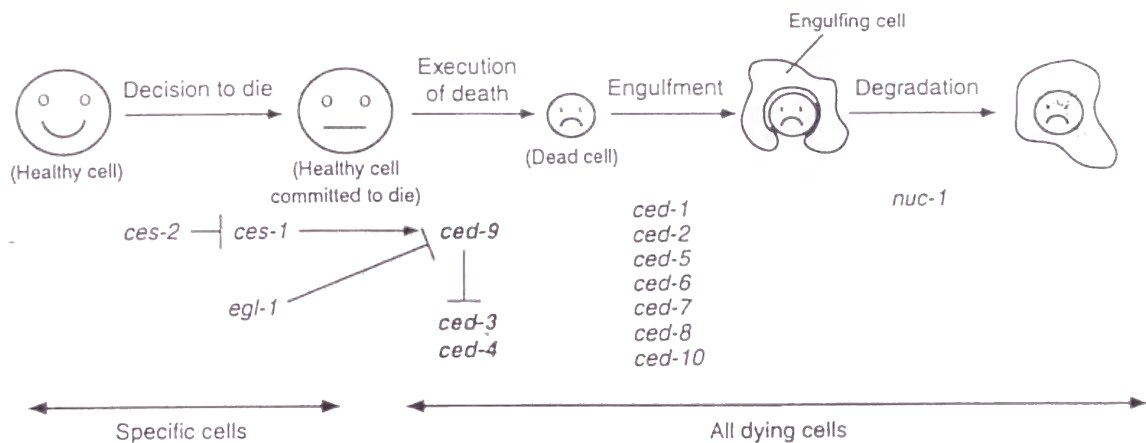


図1-3 *C.elegans*におけるアポトーシスの遺伝学的制御経路

*C.elegans*において観察されるアポトーシス実行の各段階で、14の異なる遺伝子が働いていることが、変異株の遺伝学的解析により示された。アポトーシスを実行するかどうかを決定する遺伝子への変異は一部の神経細胞にしか影響しないが、アポトーシスの実行から食食消化に関わる遺伝子への変異は、すべての体細胞において影響がみられ、共通して働いていることがわかっている。*ced-3*と*ced-4*は細胞死を促進し、*ced-9*は細胞死を抑制する。これらの遺伝子の上下関係は二重変異の組み合わせから演繹的に明らかとなった。(Steller, 1995. より引用)

記号：→ (正の制御) ; ⊣ (負の制御)。

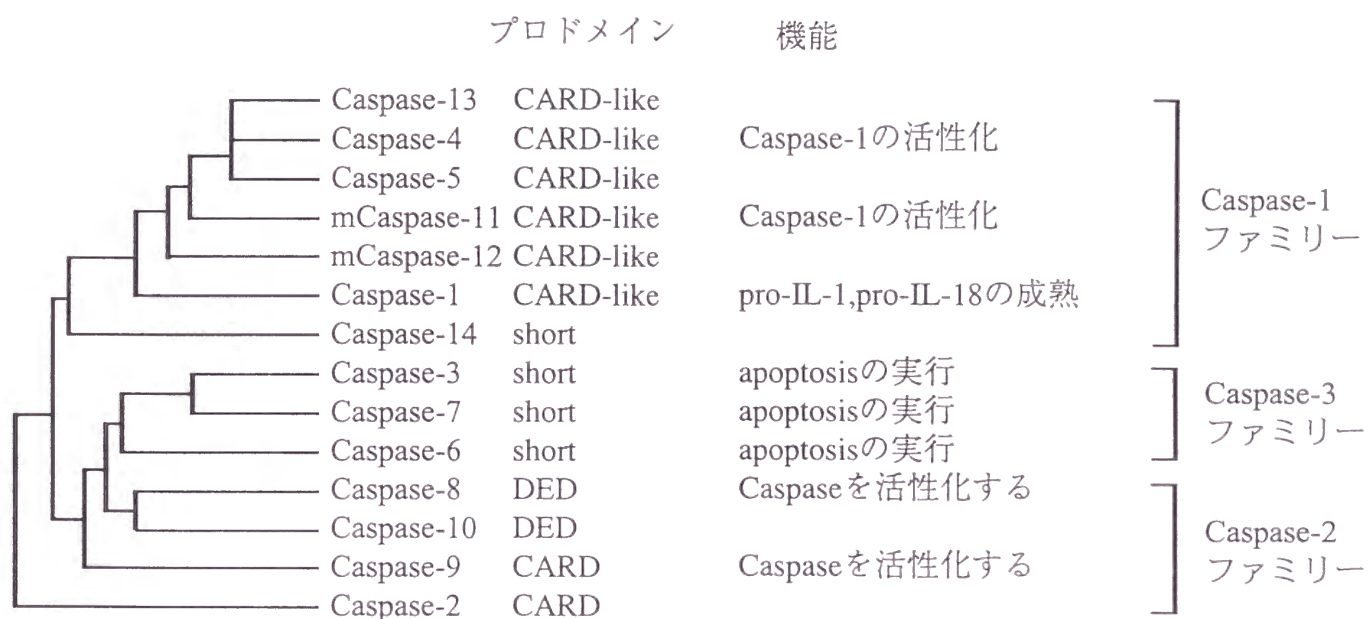


図1-4 Caspaseの系統図と分類

造はアミノ末端からプロドメイン、大サブユニット、小サブユニットに分かれる（図 1-5）。プロドメインは、他のタンパクとの結合に関わる部位で、プロドメインを介した多量体化がきっかけとなり Zymogen が切断される。切断された Caspase は、それぞれ二つずつの大サブユニットと小サブユニットからなる四量体を形成して活性型となり、基質タンパクを切断する（図 1-5）。Caspase は基質タンパクとして他の Caspase を切断する活性をもつ。Caspase-8 は pro-Caspase-3、-4、-7、-9(Kang et al., 1999; Muzio et al., 1997; Srinivasula et al., 1996a; Stennicke et al., 1998; Takahashi et al., 1997)を、Caspase-10 は pro-Caspase-3、-7、-8 (Fernandes-Alnemri et al., 1996; Kang et al., 1999) を *in vitro* または酵母内で基質として切断し活性化することが示されている。また、Caspase-9 は pro-Caspase-3 (Deveraux et al., 1998; Li et al., 1997; Srinivasula et al., 1998)、-7 (Srinivasula et al., 1998) を切断活性化し、Caspase-3 は pro-Caspase-6 (Hirata et al., 1998; Srinivasula et al., 1998; Srinivasula et al., 1996b) と pro-Caspase-2 (Slee et al., 1999) を切断活性化する。さらに、Caspase-6 は pro-Caspase-8、-10 を切断活性化する (Slee et al., 1999)。このように Caspase 間で活性化のネットワークが形成されているため、一つの Caspase が活性化されると、他の Caspase も次々と活性化されていく（図 1-6）(de Craen et al., 1999; Slee et al., 1999)。

活性化された Caspase の基質となるタンパクの中で、アポトーシスを引き起こすために必須であるタンパクはなく、基質タンパク全体として細胞が生存を維持し増殖していくために必要となるタンパク群が機能を失う、あるいは脱制御することで細胞が死んでしまうと考えられている（図 1-7）(Earnshaw et al., 1999)。細胞質タンパクではアクチン、ゲルゾリン、 α -フォドリン、 β -カテニンや中間経フィラメントのケラチン 18 等の細胞膜の維持や接着に必要と考えられるタンパクが切断される。また、核内タンパクではラミン A および B、ラミン B レセプター等の核膜の維持や、HnRNP タンパク C1 および C2、U1 small ribonucleoprotein の 70-kDa コンポーネントなどスプライシング等に関わるタン

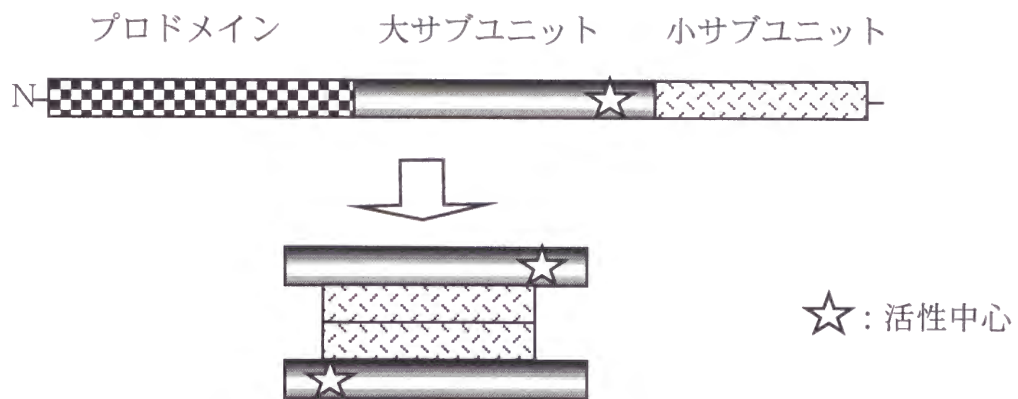


図1-5 Caspaseの構造

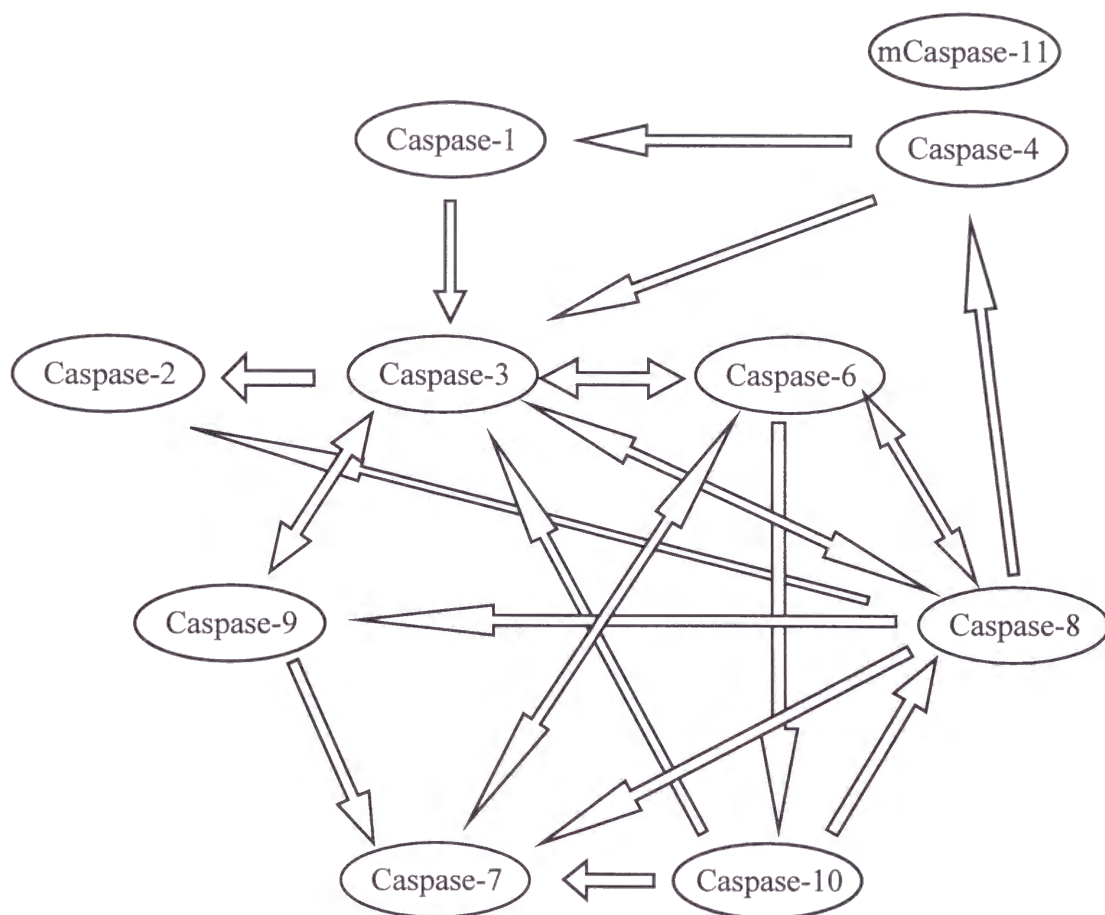


図1-6 Caspase経路のネットワーク

Polypeptides	Cleavage site	Responsible caspase	Proposed effect of cleavage
Abundant cytoplasmic proteins			
Gelsolin	DQTD/G	3	Calcium-insensitive actin cleavage
Gas-2	SRVD/G	?	Cytoskeleton rearrangement
Fodrin (Alpha II-spectrin)	DETD/S DSLSD/S	3	Plasma membrane blebbing
Beta II-spectrin	DEVDIS	3	Unknown
?-Catenin	?	3	↓ α -Catenin binding and cell-cell contact
Cytokeratin 18	VEVD/A	3, 6, 7	?
Abundant nuclear proteins			
Lamin A	VEID/N	6	Nuclear lamina disassembly
Lamin B ₁	VEVD/S	6, 7	Nuclear lamina disassembly
NuMA	?	3, 6	Nuclear shape changes
HnRNP proteins C1 and C2	?	3	↓RNA processing
70-kDa protein of U1 snRNP	DGPD/G	3	↓RNA processing
mdm2	DVPD/C	3, 6, 7	Unknown, still binds p53
Proteins involved in DNA metabolism and repair			
PARP	DEVD/G	3, 7, 9	↓Synthesis of poly(ADP-ribose)
DNA-PKcs	DEVD/N	3	↓Activity in some studies
Replication Factor C large subunit	DEVD/G	3	N-terminal fragment inhibits DNA replication
Topoisomerase I	DDVD/Y	3	Unknown
Protein kinases			
PKC δ	DMQD/M	3	Constitutively active kinase
PKC ϵ	DEVD/K	3	Constitutively active kinase
PKC-related kinase 2	DITD/C	3	?Constitutively active kinase
PKN	LGTD/S	3	Constitutively active kinase
Calcium/calmodulin dependent protein kinase IV	PAPD/A	3	Unknown function
p21-activated kinase 2	SHVD/G	3, 8	Constitutively active kinase
PITSLRE kinase α 2-1	YVPD/S	3	Constitutively active kinase
Mst1 kinase	DEMD/S	?	Constitutively active kinase
Mst2 kinase	DELD/S	?	Constitutively active kinase
Focal adhesion kinase	DQTD/S VSWD/S	3, 7, 6	Loss of paxillin binding, ? translocation nucleus, ↓ activity
MEKK-1	DTVD/G	3	↓Binding to 14-3-3, Δ subcellular distribution, constitutive activation
Wee1 kinase	?	3, 7, 8	Probably inactivation, leading to Cdk activation

図1-7 Caspaseの基質となるタンパク一覧

Other proteins involved in signal transduction and gene expression

Pro-interleukin-1?	FEAD/G	1	Key mediator of inflammation
	YVHD/A		
Pro-interleukin-16	SSTD/S	3	T lymphocyte chemotaxis
Pro-interleukin-18	LESD/N	1	Induces synthesis of interferon γ
Ras GTPase-activating protein	DTVD/G	3	Inactivation of survival signaling from extracellular receptors
D4-GDP dissociation inhibitor	DELD/S	3	No demonstrated effect
Protein phosphatase 2A subunit A α	DEQD/S	3	\uparrow Activity toward non-cdk substrates
Cytosolic phospholipase A ₂	DELD/A	3	Activation
Stat 1	MELD/G	3	\downarrow Transcription after interferon α or γ
NF κ Bp50, p65	?	3	\downarrow NF κ B-dependent transcription
I κ B	DRHD/S	3	?Generates constitutive inhibitor of NF κ B
Steroid response element-binding proteins	DEPD/S SEPD/S	3, 7	Nonphysiological cleavage
DCC	LSVD/R	3	Product facilitates ligand withdrawal-induced apoptosis
Calpastatin	ALDD/S, LSSD/F, ALAD/S	1, 3, 7	Decreased inhibition of calpain

Proteins involved in regulation of cell cycle and proliferation^b

p21 ^{waf1}	DHVD/L	3, 7	Loss of N-terminal cdk inhibitory domain from nucleus
p27 ^{kip1}	DPSD/S	3, 7	\downarrow p27 in cyclin E-cdk complexes
Rb (retinoblastoma) protein	DEAD/G	3	Unopposed E2F-1 action
CDC27	?	3	\downarrow Ubiquitin ligase, stabilization of cyclins A and B

Proteins Involved in Human Genetic Diseases

Huntington	DSVD/L	3, 7	Possible nonphysiological cleavage (cf. 372)
Dentatorubral pallidolysian atrophy protein	DSL/D/G	3	No known effect
Presenilin-1	ARQD/S	?	Unknown
Presenilin-2	DSYD/S	3	Generates antiapoptotic fragment

Apoptotic regulatory proteins

Bcl-2	DAGD/V	?	Generates proapoptotic fragment
Bcl-X _L	HLAD/S	1, 3	Generates proapoptotic fragment
FLIP _L	LEVD/G	3, 8, 10	Unknown
Bid	LQTD/G	8	Generates proapoptotic fragment
Bax	FIQD/R	?	Unknown
ICAD	DEPD/S	3	Liberates active CAD endonuclease

パクが切断不活化される。DNA の代謝や修復、染色体構造の維持に関わるタンパクでは、PARP、DNA-PKcs、DNA トポイソメラーゼ I および II 等が切断不活化される。プロテインキナーゼでは、PKC やカルモジュリン依存性キナーゼ CaMKIV、Ste20 様キナーゼ MST1/2、Raf1 (MEKK1) 、p21-activated キナーゼ (PAK2) 、focal adhesion キナーゼ (pp125FAK) 、AKT1 や c-src 等が切断される。PKC、MST1/2、Raf1 や PAK などは Caspase によって切断された結果、活性化するものもある。シグナル伝達に関わるタンパクでは、プロインターロイキン-1 β 、-16、-18 などの炎症性サイトカインや RasGAP、Cbl、D4--GDI、PP2A、cPLC2、STAT1、NF- κ B 等が切断不活化される。細胞周期や細胞増殖に関わるタンパクでは、p21Waf1/Cip1、p27Kip1、pRB 等が切断される。また、Caspase はアポトーシスを抑制するタンパクである Bcl-2、Bcl-XL を切断してアポトーシス抑制活性を失活させると同時に、アポトーシスを促進する断片を生成する。Bid も Caspase によって切断されることにより、アポトーシスを促進する断片を生成する。また、ICAD/DFF45 は DNase である CAD/DFF40 に結合して活性を抑えているタンパクであるが、Caspase によって切断されると活性型 CAD/DFF40 を放出して染色体の分解を引き起こすタンパクもある。

Caspase はその生理的機能から二つに分類され、一つは炎症性サイトカインの活性化に関わっており、もう一つはアポトーシスの実行に関わっている。炎症性サイトカインの活性化に関わっている Caspase-1 はインターロイキン-1 β 、-1 α 、-18 を活性化し、またアポトーシスの実行に関わる Caspase と共通する DEVD 切断活性を有する Caspase-3-like な Caspase がインターロイキン-16 を活性化する。アポトーシスに関わっている Caspase は、イニシエーター Caspase といわれる大きなプロドメインをもつグループと、エフェクター Caspase といわれる小さなプロドメインしかもたない或いはプロドメインをもたないグループに分けられる。プロドメインはアダプタータンパクとの結合に必要で、刺激に応じ

たアダプタータンパクの多量体化 (oligomerization) を通じてイニシエーター Caspase が活性化される。活性化されたイニシエーター Caspase は、続いてエフェクター Caspase を活性化し、エフェクター Caspase が細胞内タンパクを分解しアポトーシスが実行される。イニシエーター Caspase のもつプロドメインはそのアミノ酸配列から、Caspase-1、-2、-4 (human)、-9、-11(mouse)にみられる CARD (Caspase Recruitment Domain) と Caspase-8、-10 にみられる DED (Death Effector Domain) とに分類される (図 1-4)。

1-4 イニシエーター Caspase の活性化

現在のところアポトーシスにおけるイニシエーター Caspase の活性化には、ミトコンドリアにおける Apaf-1 とシトクロム c による活性化と細胞膜におけるデスレセプター (Death Receptor) を介した活性化の二経路が明らかとなっている (Salvesen and Dixit, 1999)。ミトコンドリアからの Caspase の活性化においては、薬剤、紫外線、ガンマ線、増殖因子除去によるアポトーシス誘導刺激を受けると、ミトコンドリアの VDAC (=voltage-dependent anion channel) (Shimizu et al., 1999) からシトクロム c が放出され、ced-4 と相同性の高い Apaf-1 と結合し、Apaf-1 が多量体化すると考えられている (Adrain et al., 1999)。CARD を介して Apaf-1 と結合している Caspase-9 はシトクロム c の放出がきっかけとなり、Apaf-1 とともに多量体化し活性化される (図 1-8)。細胞膜における Caspase の活性化に関わるデスレセプターには、TNFR1、Fas (CD95、APO-1)、DR3、DR4、DR5、DR6 などあるが、これらの分子に特徴は細胞内領域に Death Domain (DD) といわれる領域をもち、アポトーシス誘導活性をもつことである (Nagata, 1997, Ashkenazi et al., 1999)。アポトーシスを誘導するという点でもっともよく研究されているものは、最初に細胞傷害活性のある抗体が同定され、それによって遺伝子がクローニングされた Fas である (Yonehara et al., 1989, Itoh et al., 1991)。Fas はリガンドによって刺激されると三量体化して、細胞内領域の DD にアダ

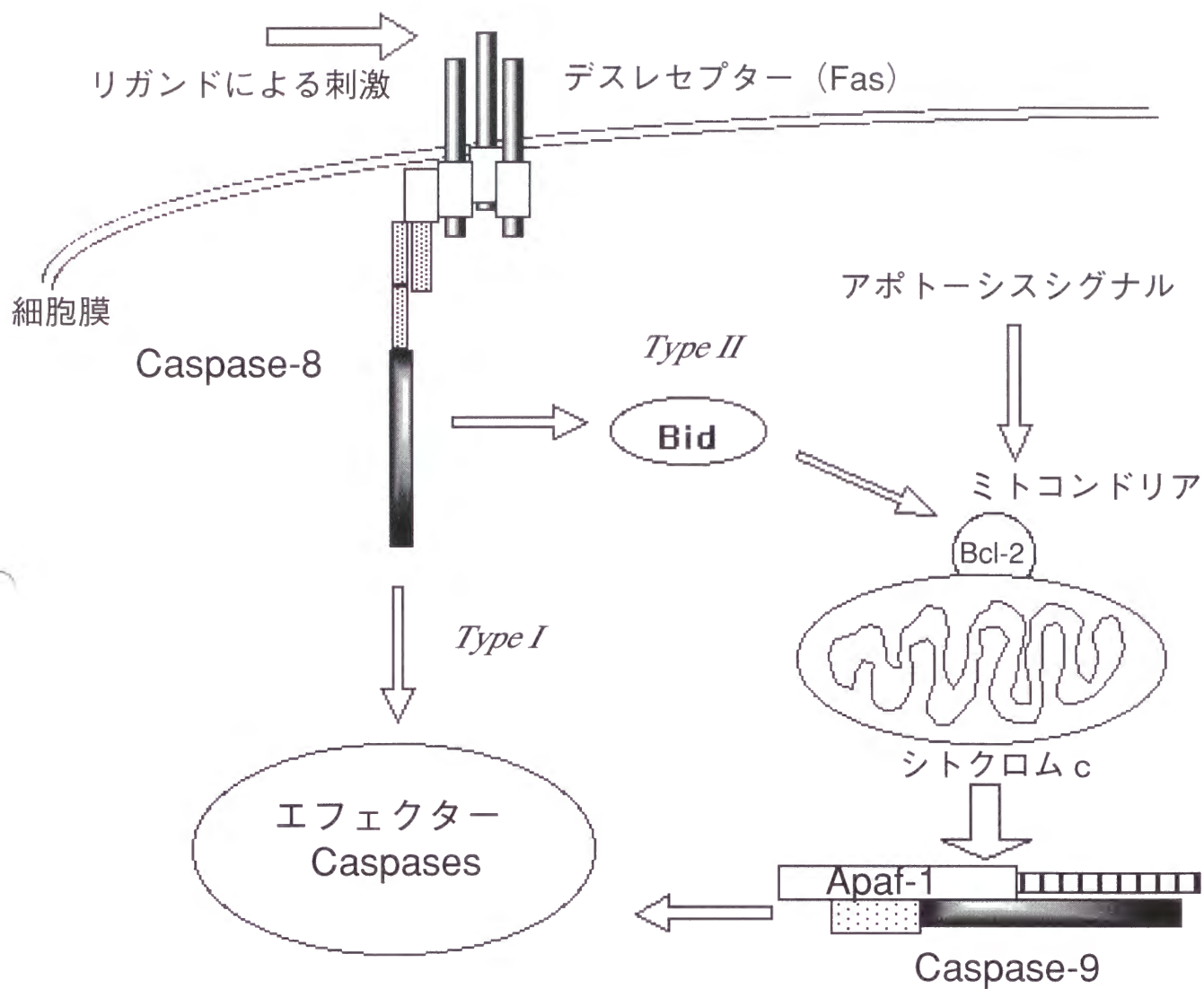


図1-8 イニシエーターCaspaseの活性化経路

イニシエーターCaspaseの活性化を阻害する

- Bcl-2ファミリー : ミトコンドリアからのシトクロム c の放出抑制
- Decoyレセプター : デスレセプターと競合してリガンドを吸収する
- c-FLIP、v-FLIP : DISCの形成を阻害する

Caspaseを直接阻害する

IAPs, CrmA, p35,

その他

Large T 抗原 : p53の活性を阻害する。

図1-9 アポトーシスを抑制する遺伝子と抑制機構

プタータンパクである FADD (Boldin et al., 1995, Chinnaiyan et al., 1995) をリクルートしてくる。FADD はアミノ末端側に DED、カルボキシル末端側に DD をもつタンパクで、Caspase-8 (FLICE/MACH/MCH5) (Muzio et al., 1996, Boldin et al., 1996, Srinivasula et al., 1996a) の DED と結合して Fas の細胞質領域に Caspase-8 をリクルートし death-inducing signaling complex (DISC) (Kischkel et al., 1995) を形成し、Caspase-8 を活性化させる (図 1-8) (Medema et al., 1997)。

1-5 アポトーシスを抑制する機構

アポトーシスの実行では Caspase を活性化する必要があるが、これを抑制する機構もいくつか知られている (図 1-9)。ミトコンドリアから始まる Caspase の活性化を抑制する遺伝子に Bcl-2 ファミリーがある。Bcl-2 ファミリーは、シトクローム c をミトコンドリアから放出するのに使われるチャネルの開放を防ぎ、ミトコンドリアの膜電位を維持することによって、Caspase-9 の活性化を妨げていると考えられている。Bcl-2 ファミリーの中には、逆にアポトーシスを誘導する活性をもつ分子もある (図 1-10)。構造的には、Bcl-2 ファミリー間で保存された領域が 4 つ (BH1~BH4) 存在するが、Bcl-2 ファミリーのメンバーはこれらのドメインのいくつかで構成される。カルボキシル末端に疎水性アミノ酸を持つメンバーはミトコンドリア、核、ER の膜にアンカーされる。

また、デスレセプターによって誘導されるアポトーシスはデコイレセプター (DcR) によるデスリガンドの競合的吸収 (Aschkenazi et al., 1999) や FLIP による DISC 形成阻害によって、抑制される。DcR1 および 2 はともに DR4 および 5 と競合してリガンドである TRAIL に結合する。DcR1 は細胞質領域を欠くが、グリコフォスホオリピッドの修飾によって膜にアンカーされている。DcR2 は不完全長の DD (およそ 3 分の 2) をもつが、アポトーシス誘導活性はない。DcR3 は細胞膜貫通領域をもたず、可溶性タンパクとして存在し、FasL に Fas と同等のアフィニティーで結合し Fas のアポトーシスを阻害する。可溶性タン

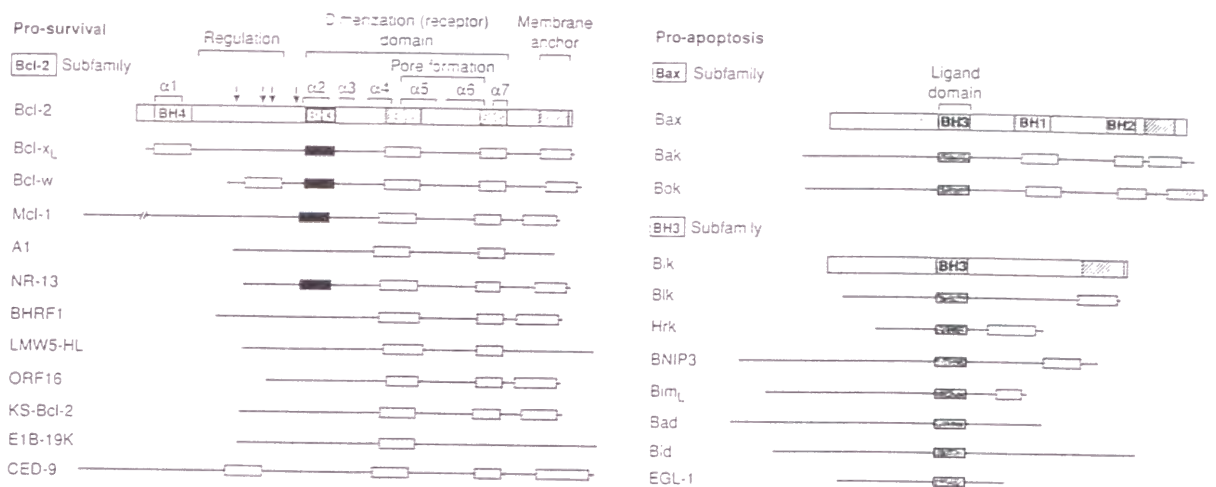


図1-10 Bcl-2ファミリーの構造 (Adams et al., 1998.より引用)

生理的にアポトーシスを誘導する刺激

- 1、TNFファミリー (Fasリガンド、TNF)
- 2、TGF β ファミリー
- 3、神経伝達物質 (グルタミン、ドーパミン、N-methyl-D-aspartate)
- 4、増殖因子除去
- 5、細胞外マトリックスとの接着阻害
- 6、カルシウム
- 7、グルココルチコイド

ダメージによるアポトーシス誘導

- 1、熱ショック
- 2、ウイルス感染
- 3、バクテリアのエンドトキシン
- 4、癌遺伝子 (myc、rel、E1A)
- 5、癌抑制遺伝子p53
- 6、細胞傷害性T細胞
- 7、酸化ストレス
- 8、フリーラジカル
- 9、養分除去ー代謝阻害

治療によるアポトーシス

- 1、化学治療薬 (シスプラチン、ブレオマイシン、ドキソルビシン等)
- 2、ガンマ線照射
- 3、紫外線照射

毒物によるアポトーシス

- 1、エタノール
- 2、 β -アミロイドペプチド

図1-11 アポトーシスを誘導する刺激一覧

パクで TNFR と相同性のあるオステオプロテゲリン (OPG) もアフィニティは低いですが TRAIL に結合し、DR4 および 5 によるアポトーシスを阻害する。FLIP はプロテアーゼ活性をもたない Caspase-8 であり DISC に入り込んで Caspase-8 が DISC に入るのを阻害すると考えられている。ウイルスにも同様の遺伝子があり、デスレセプターによるアポトーシスの抑制にはたらくウイルスの FLIP を v-FLIP、細胞自身のもつ FLIP を c-FLIP と呼ぶことが多い。Caspase の活性を直接阻害するによってアポトーシスを抑制する遺伝子もある。IAP ファミリー、CrmA (Cowpoxvirus)、p35 (Baculovirus) などがある。XIAP、cIAP1、cIAP2、Survivin は pro-Caspase-9 に結合して活性化を抑制し、また活性化した Caspase-3 の活性も抑制する。SV40 の Large T 抗原のように p53 に結合してアポトーシスを抑制する活性のあるものもある (Levine, 1997)。Fas によるアポトーシスも、細胞によって Bcl-XL によって抑制されることがわかっている (図 1-8)。Bcl-XL によって Fas によるアポトーシスが抑制されない細胞をタイプ I、抑制される細胞をタイプ II と分類されているが、その違いの原因ははっきりとわかっていない。

1-6 アポトーシスを誘導する刺激

様々な刺激が細胞にアポトーシスを誘導する (図 1-11)。生理的状态でのアポトーシス誘導は、先に述べたとおり TNF ファミリーによるものや、TGF- β ファミリー、神経伝達物質、成長因子除去、カルシウム、グルココルチコイドやアルツハイマー病で神経細胞に蓄積するタンパク β -アミロイドペプチドによるものが挙げられる。さらに細胞の癌化を防ぐための癌抑制遺伝子である p53 が活性化した場合におこるアポトーシスがある。そのため癌遺伝子である myc、rel、E1A が発現した場合にアポトーシスが引き起こされる。また、細胞が熱ショック、ウイルス感染、バクテリアのエンドトキシン、酸化剤、アルコール、フリーラディカル、アミノ酸などの栄養物質除去等、ダメージを受けた場合にも、

アポトーシスは誘導される。細胞にダメージを与えて細胞を殺すことを目的にアポトーシスを誘導する薬剤（シスプラチン、ドキソルビシン、エトポシド等）や放射線、紫外線が癌の治療のために使われている。

1-7 アポトーシスを抑制するシグナル伝達経路

イニシエーター Caspase である Caspase-8 および-9 を活性化する刺激によって誘導されるアポトーシスを抑制するシグナル伝達経路が研究が行われてきている。ある種のアポトーシスは PKB/Akt や MAPK/ERK の活性化によって抑制されることが報告されている。具体的には神経細胞における神経成長因子 (NGF ; Nerve growth factor) の除去によって誘導されるアポトーシスは NGF や IGF-1 による PKB/Akt の活性化によって抑制される (Dudek et al., 1997, Philpott et al., 1997) 。また、生存増殖に IL-3 を必要とする造血細胞でも、PKB/Akt の活性化によってアポトーシスが抑えられることが報告されている (Songyang et al., 1997) 。ほかにも PKB/Akt の活性化によって、繊維芽細胞において無血清状態で Myc が誘導するアポトーシス (Kennedy et al., 1997, Kauffmann-Zeh et al., 1997) や上皮細胞での細胞外マトリックスからの遊離によって誘導されるアポトーシス (Khwaja et al., 1997) が抑制されることが報告されている。MAPK の活性化でも、NGF 除去による神経細胞死 (Xia et al., 1995) やショウジョウバエに見られる Hid の発現によるアポトーシスの誘導 (Kurada and White, 1998, Bergmann et al., 1998) が抑制されることが報告されている。

生理的現象でデスレセプターによるアポトーシスが抑制される例も報告されている。抗原刺激によって T 細胞 (Klas et al., 1993; Owen-Schaub et al., 1992) や B 細胞 (Rothstein et al., 1995) が活性化されると、その直後に Fas の発現が上昇する。しかし抗原刺激後数日間抗 Fas 刺激に対して抵抗性を示し、さらに抗原刺激後 1 週間ほどで抗 Fas 刺激に感受性となる。c-FLIP が Fas によるアポトーシスを抑制することが報告されると (Irmeler et al., 1997) 、それに続いて c-FLIP

が生理的な Fas を介するアポトーシス誘導阻害にはたらくことが報告された。すなわち、抗原刺激による T リンパ球の活性化に伴って c-FLIP の発現が上昇し、Fas を介するアポトーシスが阻害されるようになるという。また、MAPKK の阻害剤を抗原刺激時に処理することによって T 細胞が抗 Fas 刺激に感受性となり、このときに c-FLIP の発現上昇が抑えられたと報告された (Yeh et al., 1998)。このことから、T 細胞や B 細胞において抗原刺激直後、Fas を発現していながら抗 Fas 刺激に対して抵抗性となる現象の原因が、c-FLIP の発現上昇にあることが示唆された。しかしながら、抗 Fas 刺激に抵抗性を示す抗原刺激直後と抗 Fas 刺激に感受性となる抗原刺激後 6 日目での c-FLIP の発現量に変化がなかったことから、Fas によるアポトーシス誘導機構において c-FLIP 以外で MAPKK の阻害剤によって影響を受ける未知の調節機構がはたらいっていることが示唆されている (Scaffidi et al., 1999)。

1-8 Ras による Fas を介するアポトーシスの調節

PKB/Akt と MAPK の両方の活性化を制御している分子がスモール G タンパク Ras である。原癌遺伝子として知られる Ras はカルボキシル末端がファーンシル化されるため細胞膜にアンカーされており GTPase 活性をもつタンパクである。GTP と結合して活性型となると、Raf、PI-3 キナーゼ、RalGDS などと結合しこれらの分子を活性化させる。ここで我々は、マウス胎児繊維芽細胞 Balb3T3 に Fas を安定に発現させた FH2 細胞において、c-K-Ras が Fas を介するアポトーシスを抑制することを報告する。さらに、c-K-Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制は、Ras の活性化によるもので MAPK 経路の活性化が重要であることも示した。また、bFGF 刺激による生理的な Ras/MAPK の活性化によっても、Fas を介するアポトーシスが抑制されることがわかった。しかしながら、EGF や IGF-1 刺激による MAPK の活性化ではアポトーシスが抑制されなかったため、これらの増殖因子と bFGF における MAPK の活性化の違いについても

検討を行った。Fas は自己反応性のリンパ球や癌細胞の除去に関わっているが (Zornig et al., 1995, Peng et al., 1996, Maeda et al., 1999) 、Ras による PI-3 キナーゼ/Akt 経路の活性化により endogenous な Fas の発現が抑制され、その結果細胞の癌化が促進されるという報告がなされた (Peli et al., 1999) 。そこで我々の実験系においてアポトーシスを抑制した Ras/MAPK の活性化が、Fas の発現量を調整しているのかどうかについての検討も行った。

第 2 章 材料と方法

2-1 大腸菌

大腸菌株 DH10B/F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galK γ rpsL nupG (GibcoBRL) をプラスミド構築のために使用した。大腸菌の培養は、LB 培地を用いて 37℃にて行った。

2-2 合成オリゴヌクレオチド

本実験に用いた合成オリゴヌクレオチドは、サイメディア社に依頼して合成したものを使用した。

2-3 DNA 塩基配列の決定法 (Dye Terminator Cycle Sequence)

0.5ml の PCR 用チューブに、プライマー 3.2~4.0pmol、プラスミド DNA 0.25~0.5 μ g、シーケンス用プレミックス (Amersham Life Science) 4 μ l に純水を全量が 20 μ l になるように加え、よく混合した。PCR のサイクルは 96℃1 分—(96℃10 秒—50℃5 秒—60℃4 分) 25 サイクル—4℃hold で行った。反応後、75 μ l の 70%エタノールを加え、4℃、15000rpm、20 分間遠心し、沈殿を乾燥させた。これに脱イオン化ホルムアミドと 25mM EDTA/50mg/ml ブルーデキストランを、5:1 で混合した溶液 6 μ l または TSR (PERKIN ELMER) 15 μ l を加え、90℃で 2 分間加熱し、すぐ氷令した。これを ABI PRISM 377 または 310 で解析を行った。

2-4 細胞株

マウス胎児繊維芽細胞 Balb3T3 は 永田 和宏 先生 (京都大学再生研) より分与していただいた。細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) および 100 μ g/ml カナマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's 培地 (DMEM) で 37 度、5% CO₂ で

維持した。ヒト β -アクチンプロモーター (Gunning et al., 1987) 下にマウス Fas を発現するベクターを pRc/CMV (Invitrogen) の BamHI/HindIII サイトにハイグロマイシン B フォスフォトランスフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターとともに Balb3T3 細胞にエレクトロポレーション法 (250V、960 μ F) で導入した。200 μ g/ml ハイグロマイシンを含む 10%FCS-DMEM で遺伝子導入細胞を選択した。ついで、蛍光標識されたマウス Fas に対する抗体、FITC-RMF6 (Nishimura et al., 1995) あるいは PE-Jo2 (PharMingen, CA)、で細胞を染色し、2%ホルマリン +0.2%グルタルアルデヒドを含む PBS で固定した後、フローサイトメーターを用いて蛍光強度を測定し、Fas の発現が高い細胞をクローニングし、これを FH2 細胞と命名した。

2-5 cDNA ライブラリーとプラスミドの作成

Balb3T3 細胞のトータル RNA からオリゴ dT カラム (Pharmacia) で poly(A)+ RNA を精製し、タイムセイバー cDNA 合成キット (Pharmacia) を用いて cDNA を合成し、ついで pME18S ベクター (Sakamaki et al., 1992) の EcoRI/NotI サイトへ組み込んだ。それぞれの変異型 Ras (K-RasV12、K-RasN17、K-RasS35、K-RasG37、K-RasC40 (Kauffmann-Zeh et al., 1997)) は c-K-Ras をもとに Quick-Change site-directed mutagenesis キット (Stratagene) を用いて作成した。pJ7 Ω -lacZ (Morgenstern and Land, 1990) は β -ガラクトシダーゼの発現ベクターとして用いた。Flag-MST1KD はキナーゼ活性のない変異 MST1 であり、MST1 (Lee et al., 1998) のキナーゼ活性中心の 59 番目のアミノ酸をリジンからアルギニンに変えて村川氏により作成された。すべての変異遺伝子は DNA シーケンシングによりその配列を確認した。Raf-CAAX、 Δ p85、Akt、constitutively active Akt (HA-myr- Δ 4-129 Akt)、RalN28 はそれぞれ、J. F. Hancock (Univ. Queensland Medical School, Australia)、小川 渉 先生 (神戸大学)、吉川 潮 先生 (神戸大学)、R. Roth (Stanford Univ., CA)、L. A. Feig (Tufts Univ., MA)からそれぞれ

れいただいた。SDSE-MAPKK と MKP-1 の cDNAs は西田 栄介 先生 (京都大学) から、Green Fluorescence Protein (GFP) の発現ベクターは梅園 和彦 先生 (Kyoto Univ., Japan) からいただいた。

2-6 抗体および試薬

アゴニティック抗マウス Fas モノクローナル抗体 RK-8 (Nishimura et al., 1995) は MBL (名古屋) から提供いただいた。抗 Ras (clone18) および、抗リン酸化 p42/44 MAPK (E10) のモノクローナル抗体は Transduction Laboratories (Lexington, KY)ならびに New England Biolabs (Beverly, MA)より購入した。抗リン酸化 Akt ポリクローナル抗体は New England Biolabs より購入した。マウス submaxillary glands より精製した Epidermal Growth Factor (EGF)は Sigma (St Louis, MO)より、またヒト-リコンビナント Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) およびヒト-リコンビナント basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) は Gibco-BRL (Rockville, MD)より購入した。Caspase-3/7 および Caspase-8/6 の蛍光基質 Ac-DEVD-MCA ならびに Ac-IETD-MAC はペプチド研究所 (大阪) より購入した。 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞の染色に用いた 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D(-)-galactopyranoside (X-Gal) は和光純薬 (大阪)より購入した。

2-7 フローサイトメーターを用いた Fas の発現確認

培養シャーレに付着した細胞を PBS で三回洗浄し、5mM EDTA を含む PBS を加えて細胞を浮遊させ、96well 丸底プレートに分注した。プレート遠心用ローターを用い、1500rpm で 1 分間遠心し上澄み液を除いた。プレートを軽くたたいて細胞をばぐし、5%FBS と 0.05%NaN₂ を含む氷冷 PBS (フローサイト用バッファー) を加え、遠心して上澄み液を除いた。マウス Fas に対するモノクローナル抗体 (P4-4) を 20 μ g/ml になるように氷冷フローサイト用バッファーで希釈し、50 μ l ずつ加えた。4℃で 1 時間静置し、さらに 100 μ g/ml Propidium iodide 10 μ l を加え、4℃で 10 分間静置した。フローサイト用バッファーで三回洗浄し

た後、2% Formaldehyde、0.2% Glutalaldehyde を含む PBS を 100 μ l 加え、4℃で 10 分間静置し細胞を固定した。1600rpm で 3 分間遠心し、上澄み液を除き再びフローサイト用バッファー 100 μ l に細胞を浮遊させ、フローサイトメーター (EPICS-ELITE、コールターイムノテック社製) を用いて Fas の発現量ならびに GFP の発現を測定した。

2-8 発現クローニング法

先に述べた pME18S に組み込んだ cDNA ライブラリーをリン酸カルシウム法 (Sambrook et al., 1989) で 10cm 培養用シャーレ 5 枚のサブコンフルエントの FH2 細胞に導入した。具体的には、10% FBS を含む DMEM 中の細胞をリン酸カルシウム-DNA沈殿と 24 時間培養し、新しい培地と交換後さらに 24 時間培養した。ついで、細胞を 0.1~1.0 μ g/ml RK-8 で 4~6 時間刺激し、PBS で 3 回洗浄して死細胞を除き、培養用シャーレに付着している生細胞を回収した。回収された生細胞内のプラスミドは、伊藤らによる方法 (Itoh et al., 1991) に従って回収し、ElectroMAX DH10B コンピテント大腸菌 (Gibco-BRL) に電気穿孔法によって導入した。大腸菌をアンピシリンを含む液体 LB 培地で培養し、増幅された cDNA ライブラリープラスミドを回収精製し、再び FH2 細胞へ導入した。このサイクルを 6 回繰り返す、最終的に細胞から回収されてきたプラスミドを大腸菌へ導入した後、液体 LB 培地のかわりに、アンピシリンを含む LB プレート上で培養しコロニーを形成させ、それぞれのコロニーのプラスミドに含まれる遺伝子を解析した。

2-9 一過性遺伝子発現のための遺伝子導入方法

遺伝子導入の前日に 6well プレート 1well あたり 1×10^5 細胞をまいておく。翌日、それぞれのベクター 0.4 μ g ずつを加え合わせ、6 μ l の Plus reagent を混合した 100 μ l の無血清 DMEM を加えよく混ぜたあと 15 分間室温においた。つい

で 4 μ l の LipofectAMINE (Gibco BRL) を 100 μ l の無血清 DMEM で希釈したのち、さきの DNA 混合液に加え、よく混ぜたあとさらに 15 分間室温においた。プレート中の細胞の培養液を 1well あたり 1ml の無血清 DMEM と交換し、DNA-LipofectAMINE 混合液を加え、3 時間培養した。その後、さらに 1 ml 無血清 DMEM と 0.2ml の FCS を加え 36 時間から 48 時間、37 度 5%CO₂ で培養し、解析に用いた。

2-10 遺伝子導入細胞の細胞死評価法

FH2 細胞に pJ7 Ω -lacZ とともに目的の遺伝子を先に述べた方法で導入し、36 時間から 48 時間培養後、24well プレートに 1well あたり 2~5 x 10⁴ 細胞になるように細胞を分注した。16 時間後に 200ng/ml の RK-8 で、0 時間、4 時間、8 時間刺激した後、2%ホルムアルデヒドと 0.2%グルタルアルデヒドを含む冷 PBS で 5 分間固定した。固定後、PBS で洗浄しアポトーシスをおこして浮遊した細胞を除き、1mg/ml X-Gal、0.02% NP-40、5mM K-ferricyanide、5mM K-ferrocyanide、2mM MgCl₂ を含む PBS を加え 37 度で 1 時間加温し、付着している細胞のなかで遺伝子が導入された細胞を染色した。 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞数を well ごとに顕微鏡下で計測し、RK-8 による Fas 刺激前と刺激後での β -ガラクトシダーゼ陽性細胞数を比較した。細胞の生存率は、% Viability(生存率) = (刺激後の細胞数) / (刺激前の細胞数) として示した。細胞死アッセイでは、独立した実験を 3 回以上行った。

2-11 in vivo における Caspase-3 の活性化のモニタリング

Flag-MST1KD を Caspase-3 の基質として細胞に導入し、2 日後に 0.2 μ g/ml の RK-8 で刺激し、浮いてきた細胞と付着している細胞を合わせて回収後、50mM Tris-HCl pH7.5、1% Triton X-100、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、40mM Na₂P₂O₇、50mM NaF、5mM MgCl₂、100 μ M Na₃VO₄、10mM EDTA、protease inhibitor

cocktail (Sigma) を含む氷冷溶解バッファーで細胞を溶解した。細胞溶解液中のタンパクを 10% SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (Millipore) に転写し、5%スキムミルクを含む PBST (PBS + 0.05% Tween-20) に浸し、1 時間以上ブロッキングを行った。そこに一次抗体として抗 Flag モノクローナル抗体 M2 (Kodak) を終濃度 1 μ g/ml で加え、1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識した二次抗体を 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、ECL ウェスタンブロット検出キットを用いて、X 線フィルムに感光させることによって全長の MST1KD と Caspase-3 によって切断された MST1KD (K.K. Lee, et al., 未発表データ) を検出し、Caspase-3 が活性化しているかどうかの判定を行った。

2-12 アミドブラック染色による細胞傷害活性の評価法

アミドブラック染色による細胞傷害活性の評価は、すでに報告した方法（風間&米原、実験医学別冊「サイトカイン実験法」1997、羊土社）に基づいて行った。具体的には 96well プレートで細胞を培養し、抗 Fas 抗体によって刺激した細胞に 0.05%アミドブラックおよび 0.1M CH₃COONa を含む 9% CH₃COOH 水溶液を加え、30 分から 1 時間室温でおき固定染色した。プレート中の染色液を捨て、容器に張った水にプレートを穏やか浸し水を汲み取り、プレート中の水を捨て洗浄し、これを 2~3 回繰り返した。プレートに残った水気をできるだけ除き乾燥させた。完全に乾燥したら 1well あたり 100 μ l の 25mM NaOH を加え、細胞を溶解し、相対色素濃度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, CA) を用いて 560nm の吸光を測定した。

2-13 Caspase のプロテアーゼ活性測定法

細胞を PBS で二回洗浄し、0.5ml の反応バッファー(50mM Tris-Hcl pH7.4, 1mM EDTA, 10mM EGTA) を加え、細胞を浮遊させた。これをチューブに集め、10 μ M ジギトニンを加え、37℃に 10 分間放置した。15000rpm で 3 分間遠心し、上澄

み液中のタンパク濃度を測定した。1.6 μ g のタンパクを含む細胞抽出液に 100mM DEVD-MCA (Caspase-3/7 の基質) または IETD-MCA (Caspase-8/6 の基質) (それぞれペプチド研究所社製) と 2mM β -メルカプトエタノールを加えた反応バッファー 300 μ l 中で、37 $^{\circ}$ C で 2 時間の反応を行った。蛍光分光光度計を用いて、励起光 360nm、検出光 480nm で相対蛍光強度を計測することによって Caspase の活性を測定した。

2-14 RT-PCR 法による c-FLIP の mRNA 定量

RT-PCR には bFGF で刺激した FH2 細胞または無刺激の FH2 細胞から精製した 2 μ g の total RNA を用いた。RT-PCR の反応は Ready-To-Go RT-PCR Beads (Amersham Pharmacia, NJ) に 1.25U Pfu turbo (Stratagene, CA) を余分に加えておこなった。ここで用いたマウス c-FLIP とマウス EF1 α のプライマーは次の通りである。マウス c-FLIP_L : 5' -GAG CCA AGA TTT GTG GAA TAC CG-3' および 5'-TCT TCC AAC TGG CTA CCT AAC GAC T-3'。マウス EF1 α : 5'-TCC TAC CAC CAA CTC GTC CAA C-3' および、5'-CAG CTT CTT ACC AGA ACG ACG ATC-3'。反応サイクルは 42 $^{\circ}$ C 30 分 - 96 $^{\circ}$ C 5 分 - (96 $^{\circ}$ C 30 秒 - 52 $^{\circ}$ C 45 秒 - 72 $^{\circ}$ C 45) 12 サイクル以降はサイクルごとにサンプリングを行った。

第3章 結果

3-1 Fas を介するアポトーシスを阻害する遺伝子としての c-K-ras の発現クローニング

細胞の腫瘍化のステップとして、アポトーシス誘導機構の阻害が重要であることが示されている。そこで我々は、Fas を介するアポトーシスを抑制する遺伝子の検索をおこなうために、比較的正常細胞に近いとされる Balb3T3 細胞を用いて抗 Fas 刺激に対して感受性の高い細胞株の樹立をおこなった。ヒト β -アクトチンプロモーター下にマウス Fas を発現するように作成したベクターをハイグロマイシン耐性遺伝子の発現ベクターとともに Balb3T3 細胞に導入し、ハイグロマイシン B を含む DMEM 中で培養し、遺伝子が安定に発現導入された細胞を選択した。マウス Fas を安定に発現していた Balb3T3 細胞 (FH2 細胞) は抗 Fas 刺激に対して高い感受性を示した (図 3-1)。ついで我々は方法で述べたように、FH2 細胞に cDNA ライブラリー発現ベクターを導入し、抗 Fas 刺激を与えることで Fas を介するアポトーシスを抑制する遺伝子の検索をおこない、c-k-ras をクローニングした。実際に c-k-Ras が Fas を介するアポトーシスを抑制する活性があるか確認するために、c-k-ras の発現ベクターと β -ガラクトシダーゼの発現ベクターとともに FH2 細胞に導入し、抗 Fas 刺激を与えたあとの細胞の生存率を測定した。FH2 細胞は RK-8 による抗 Fas 刺激に対して濃度依存的にアポトーシスが誘導されたが (図 3-2)、c-k-ras を導入した細胞では細胞の生存率が上昇していることが示され、Ras が Fas を介するアポトーシスの抑制に関わっていることが示唆された。そのときの細胞の形態を図 3-3 に示す。ベクターを導入したコントロールでは 4 時間の抗 Fas 刺激によって繊維芽細胞特有の伸長した形態が失われ、アポトーシスをおこした細胞に特徴的な丸い形態をとり、付着能を失い培養シャーレからはがれてしまっている (図 3-3 E)。抗 Fas 刺激後でも c-k-ras を導入した細胞では、コントロールと比べて培養シャ

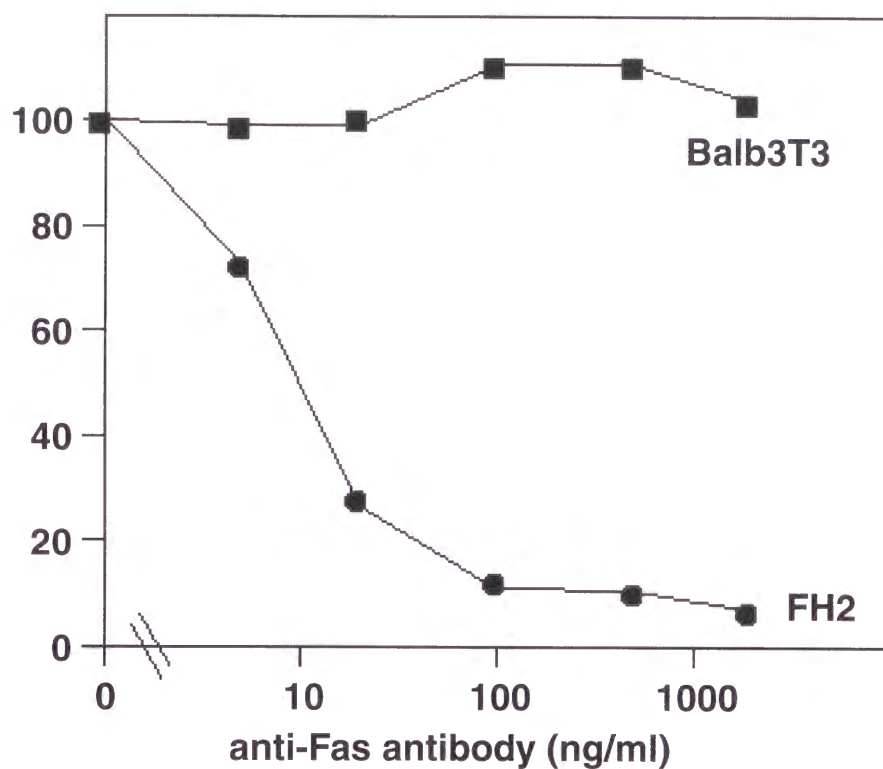


図3-1 抗Fas刺激に対するFH2細胞の感受性
 β -アクチンプロモーターで発現される外因性Fasを安定に発現している
 Balb3T3細胞株 (FH2) は抗体による抗Fas刺激

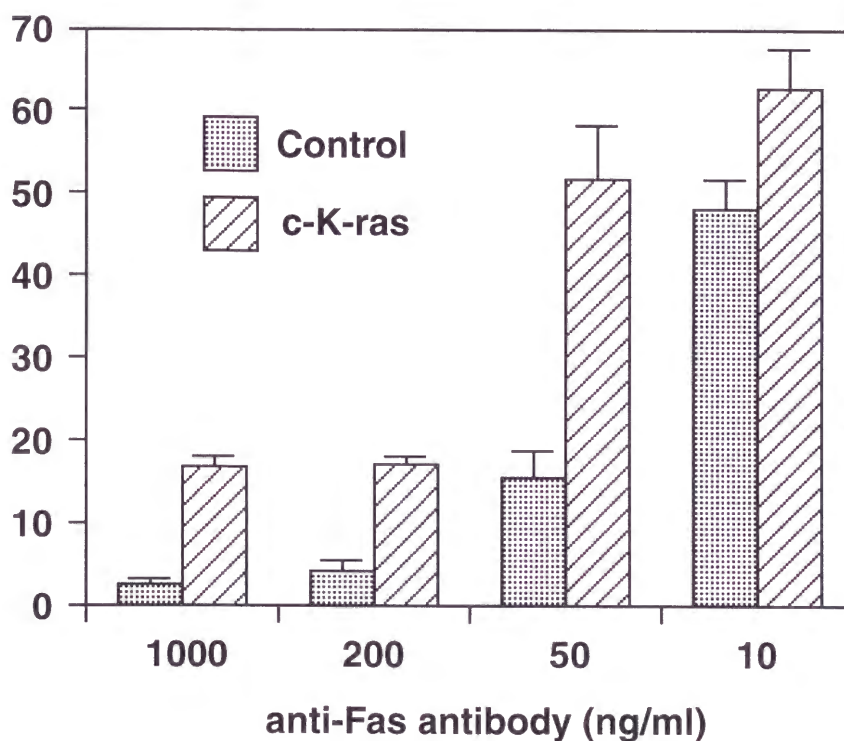


図3-2 野生型RasによるFasによるアポトーシスの抑制
 LacZとともに野生型RasをFH2細胞導入し、それぞれの濃度の抗Fas抗体で
 細胞を刺激し、8時間後に固定しX-Gal染色を行った。刺激前と刺激後で染色
 細胞数を比較して生存率を測定した。

一レに付着したままで繊維芽細胞特有の伸長した形態を維持している細胞が増えているのがわかる（図 3-3 F）。これらのことから、繊維芽細胞において c-k-Ras の発現によって Fas を介するアポトーシスに対して抵抗性となることが示された

3-2 活性型 Ras が Fas を介するアポトーシスを抑制する

Ras は GTPase 活性を持つ GTP 結合タンパクで GTP と結合することで活性化する。そこで、c-K-Ras の高発現が Fas を介するアポトーシスに対して抑制的にはたらくのは、GTP に結合した活性型 Ras の細胞内での分子数が増えた効果なのか、あるいは GDP に結合した不活性型 Ras の分子数が増えた効果なのかを検討するため、変異型 Ras を用いた実験をおこなった。活性型 Ras (K-RasV12) あるいは優勢阻害型 Ras (K-RasN17) を β -ガラクトシダーゼとともに細胞に導入し、抗 Fas 刺激前と刺激後 4 時間の時点で β -ガラクトシダーゼ陽性細胞数を計測した（図 3-3 C、D、G および H）。その結果、K-RasV12 の高発現が Fas を介するアポトーシスを強く抑制することがわかった（図 3-4）。逆に、K-RasN17 の高発現では Fas を介するアポトーシスが促進されることがわかった（図 3-4）。さらに、Ras の効果が強く現れている細胞骨格の発達した細胞は、抗 Fas 刺激を 8 時間続けても生存していた（図 3-3 I および J）。以上の結果から、繊維芽細胞において Fas を介するアポトーシスは活性型 Ras によって抑制され、優勢阻害型 Ras によって逆に促進されることが示された。

3-3 活性型 K-Ras は Caspase の活性化を阻害する

Caspase はアポトーシスの実行において中心的役割をはたしており、その活性化は厳密に制御されている。活性化した Caspase は細胞増殖や生存に必要とされる PKC や MEKK-1 などのタンパクを切断し不活化し、さらに ICAD を切断し染色体の切断に関わる CAD の活性化につながる。したがって、Caspase が

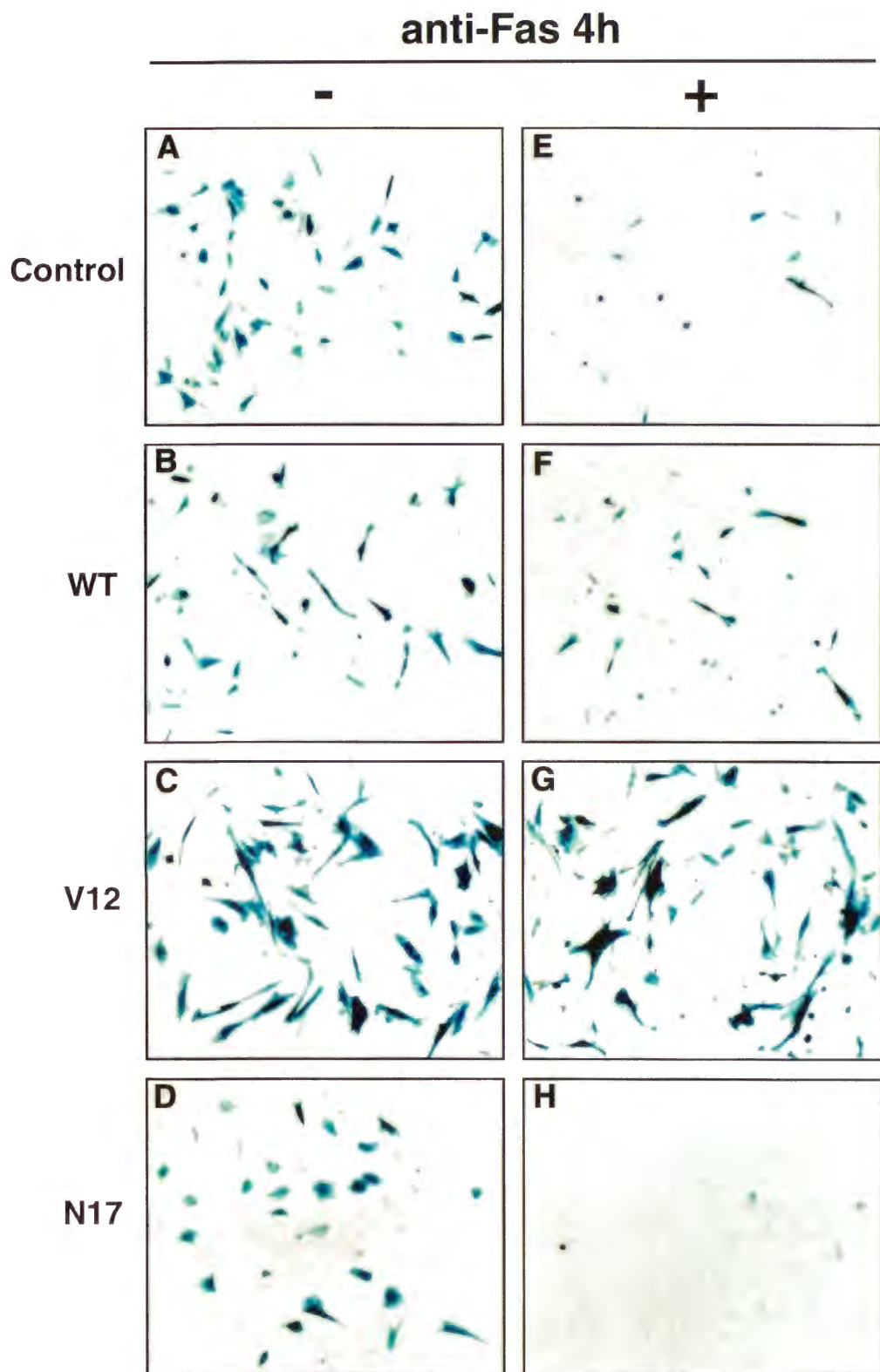


図3-3 変異型RasがFasによるアポトーシスに及ぼす影響
 FH2細胞にLacZとともに変異型Rasを導入し、4時間抗Fas刺激を与えた後、X-Gal染色した。Controlに比べ、WT（野生型）とV12（活性型）ではFas刺激後の生存細胞の割合が増えている（F and G）。逆にN17（阻害型）では、アポトーシスが促進されている（H）。

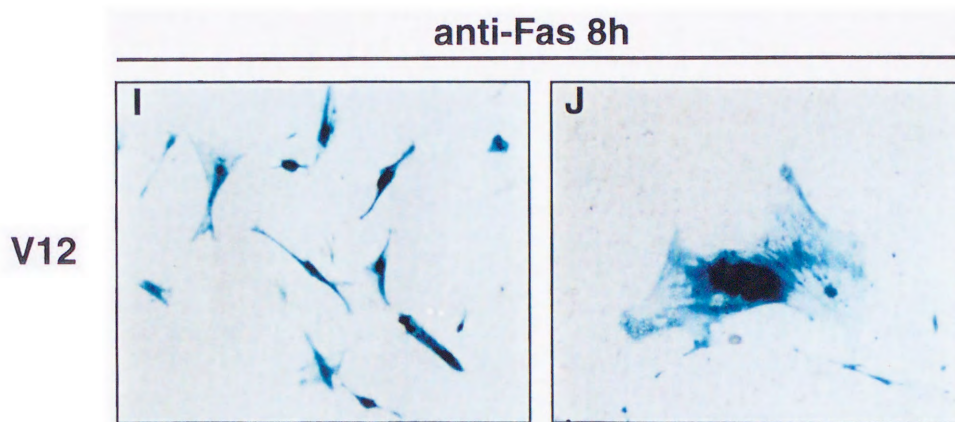


図3-3 つづき

RasV12をLacZとともにFH2細胞に導入し、8時間抗Fas刺激した後X-Gal染色した。生存していた細胞の多くは、細胞骨格が発達しておりRasの活性が強かったことを示している。従ってRasを強く活性化すると抗Fas刺激に対して強抵抗性となることが示唆された。

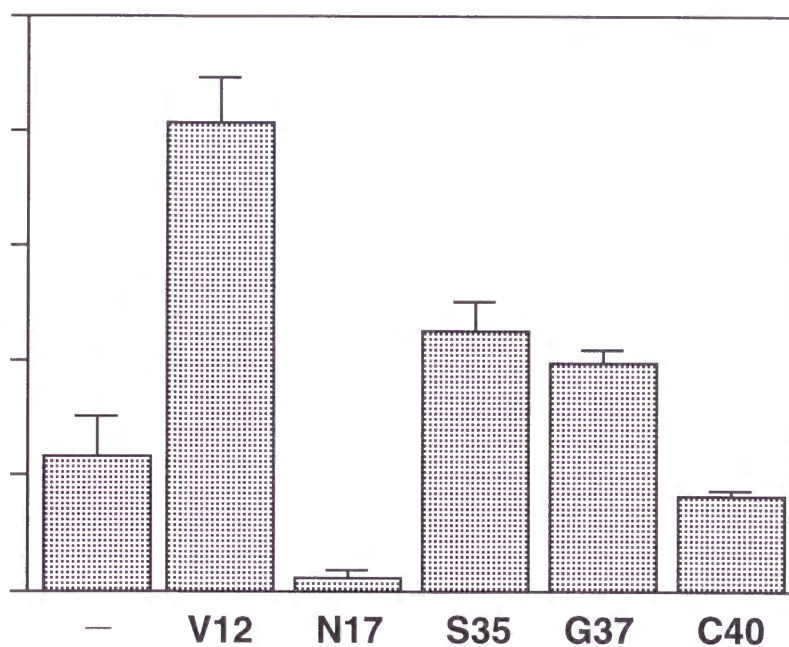


図3-4 変異型RasによるFasを介するアポトーシス感受性の変化
変異型RasLacZとともにFH2細胞に導入し、200mg/mlの抗Fas抗体で4時間細胞を刺激し、固定後X-Gal染色を行い、刺激前と刺激後で染色細胞数を比較して生存率を測定した。

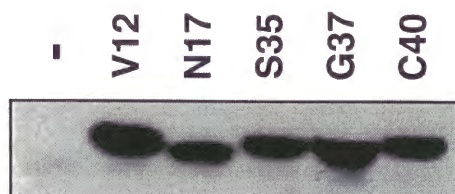


図3-5 変異型Rasの発現
FH2細胞に変異型Rasを導入し、細胞抽出液を用いてウェスタンを行った。

一旦活性化してしまうと、細胞は生存できなくなりアポトーシスから抜け出せなくなると考えられている。STE20 キナーゼファミリーの MST1 はアポトーシスの時に活性化する Caspase-3 によって、直接切断されることが *in vitro* and *in vivo* で示されている (K. K. Lee and S. Yonehara, 未発表データ)。そこで我々は、K-RasV12 による Fas を介するアポトーシスの抑制において、Caspase の活性化が抑制されているかどうか調るため、キナーゼ活性のない変異型 MST1 (MST1-KD) を RasV12 とともに細胞に導入し、抗 Fas 刺激を与えた後時間を追って MST1-KD が切断されているかどうかをウェスタンブロットによって検討した。ベクターを導入したコントロールでは抗 Fas 刺激後 1 時間で切断された MST1-KD が観察され、4 時間でほぼすべてが切断されていた (図 3-6)。一方、K-RasV12 と MST1-KD をともに導入した細胞では、1 時間では全く切断された MST1-KD は観察されず、4 時間後でも全長の MST1-KD が刺激前とほぼ等量観察された (図 3-6)。これらの結果から、K-RasV12 は抗 Fas 刺激によって活性化される Caspase の活性化を制御しうることが示された。

3-4 MAPK の活性化が Fas を介するアポトーシスを抑制する

GTP に結合した活性型 Ras は Raf、PI-3 キナーゼや RalGDS といったシグナル伝達分子を活性化し、様々な細胞応答をひき起こすことが知られている (Downward, 1998)。Ras によって活性化される分子のうち、どの分子が Fas を介するアポトーシスを抑制しているかを調べるため、部分的機能欠損変異型 Ras を用いて実験をおこなった。K-RasS35、K-RasG37、K-RasC40 は K-RasV12 にさらに変異を加えた変異型 Ras で、それぞれ Raf、RalGDS、PI-3 キナーゼのみに結合し活性化することによって、その下流の分子だけを活性化するとほうこくされている (Kauffmann-Zeh et al., 1997)。これらの変異型 Ras を作製し、細胞に導入して抗 Fas 刺激を与えたところ、K-RasC40 では生存細胞数の割合はコントロールと差は見られなかったが、K-RasS35 と K-RasG37 において生存細胞

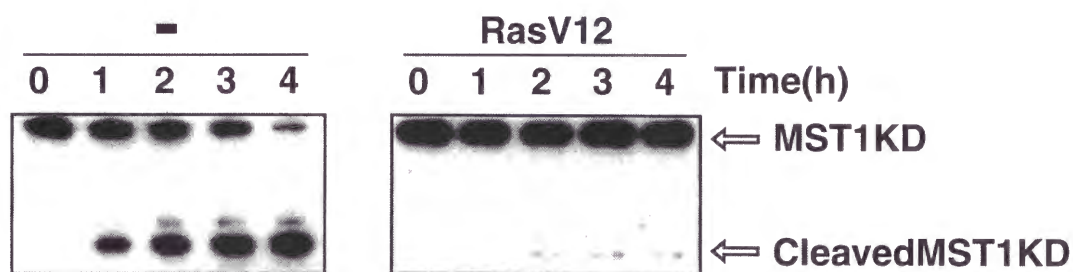


図3-6 RasV12はFasによるCaspaseの活性化を阻害する
Caspaseの基質であるSte-20ファミリーキナーゼであるMST1のキナーゼ活性を失活させた変異MST1 kinase-defective (Flag-MST1KD)をRasV12とともにFH2細胞に導入し、抗Fas刺激をしてから時間ごとに細胞質を抽出した。導入したMST1KDは抗Flag抗体によって特異的に認識した。コントロールでは時間をおって、MST1KDが切断されているのがわかる。一方、RasV12を導入した細胞ではCaspaseの活性化はおきていない。

の割合が増加した（図 3-4）。これらの結果から K-Ras によるアポトーシス抑制活性は Raf あるいは RalGDS の活性化によることが示唆された。しかし変異型 Ras の発現量に大きな差は見られなかったにもかかわらず（図 3-5）、K-RasS35 と K-RasG37 のアポトーシス抑制活性は K-RasV12 に比べて低いことから、さらにアポトーシス抑制に関わる経路の特定のための実験を行うことが必要となった。そこで活性型 Raf (Raf-CAAX) (Stokoe et al., 1994) あるいは活性型 MAPK kinase (SDSE-MAPKK) (Fukuda et al., 1997) を細胞に導入し、抗 Fas 刺激を与えたところ Raf-CAAX と SDSE-MAPKK のどちらもアポトーシスを抑制することが明らかとなった（図 3-7）。さらに、Raf-CAAX と SDSE-MAPKK でアポトーシスが抑制されているときに、Caspase の活性化も抑制されていることから（図 3-11）、Ras によるアポトーシスの抑制は Raf、MEPKK による抑制機構と同じ機構によることが示唆された。Ras/Raf/MAPKK の活性化に続くのは MAPK の活性化であるが、MAPK の活性化が Fas を介するアポトーシスの抑制にはたっているかどうかを解析するために、MAPK を脱リン酸化して不活性化する MKP-1 を RasV12、Raf-CAAX、あるいは SDSE-MAPKK とともに細胞に導入し、抗 Fas 刺激を加えた。その結果、MKP-1 を発現させることによって（図 3-8）、RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK のアポトーシス抑制活性がキャンセルされることが明らかとなった（図 3-7）。さらに、MKP-1 を導入した細胞では RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK が発現していても抗 Fas 刺激により MST1-KD が切断されたことから、Caspase 活性化の抑制も解除されていることが判明した（図 3-11）。したがって、Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制には MAPK の活性化が必要であることが示された。

RalGDS は GDP と結合した Ral の GDP-GTP 交換を促し Ral を活性化する分子である。そこで、活性型 RalGDS(MYR-RalGDS)を MST1KD とともに細胞に導入し、抗 Fas 刺激を与えたところ MST1KD が切断された（図 3-12）。したがって RalGDS 経路は Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制には関与し

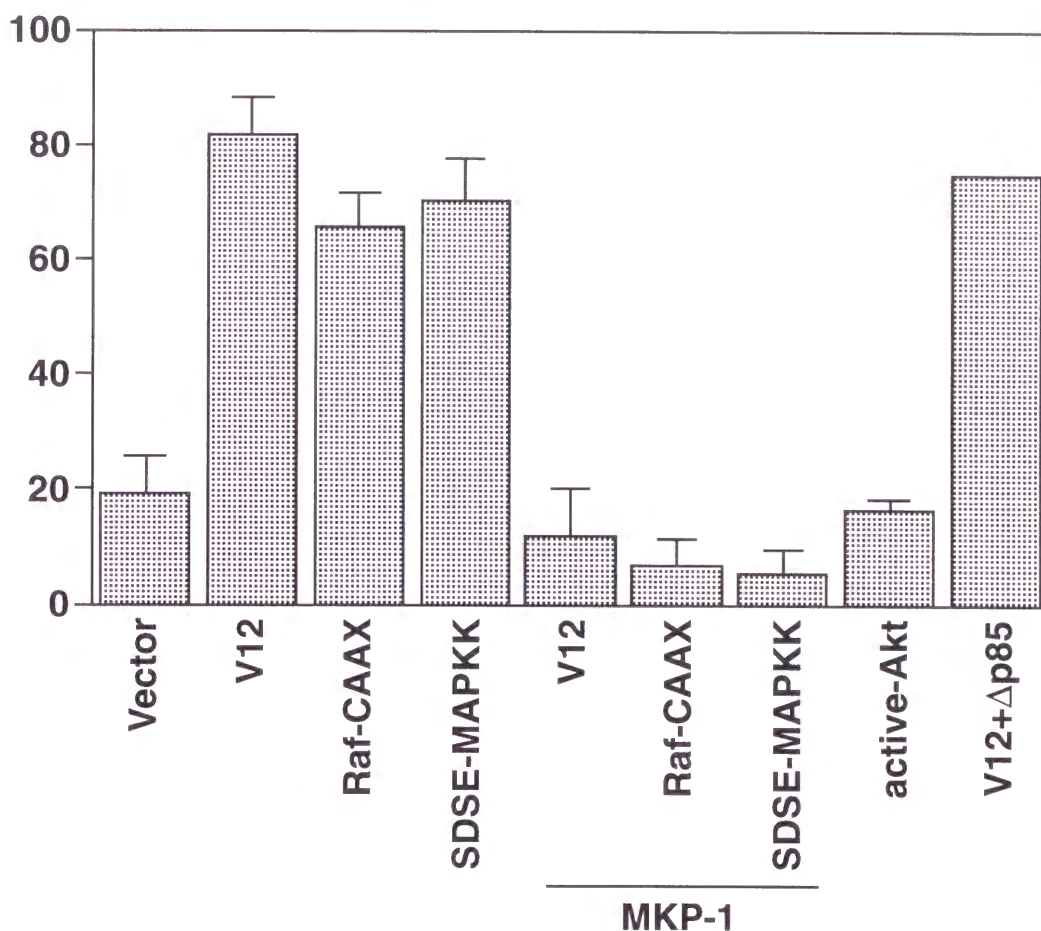


図3-7 MAPKの活性化がFasを介するアポトーシスを抑制する
RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK、active-AktをFH2細胞に導入し200ng/ml 抗Fas抗体で4時間刺激し、細胞の生存率を測定した。また、MKP-1をRasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKKとともに導入すると、アポトーシス抑制効果が無効になった。Δp85をRasV12とともに発現させてもRasのアポトーシス抑制効果は無効にならなかった。

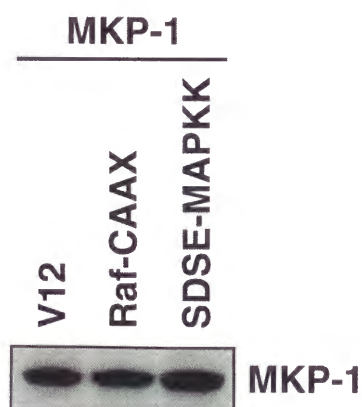


図3-8 MKP-1の発現



図3-9 active-Aktの発現

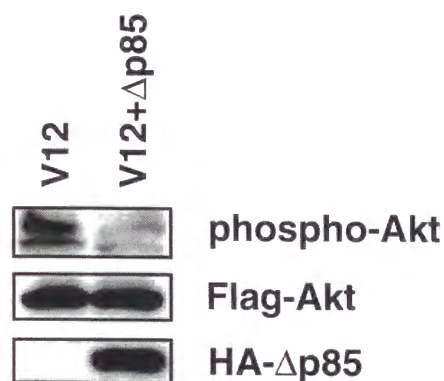


図3-10 RasV12によるAktのリン酸化はΔp85の発現によって阻害される

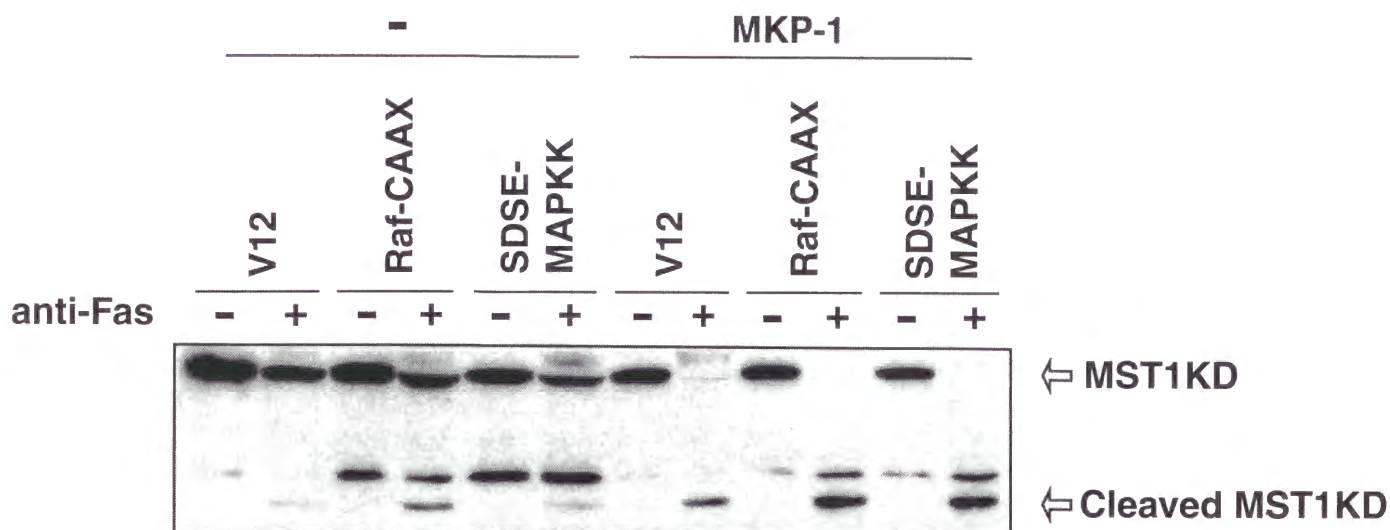


図3-11 Caspase活性化の抑制にはMAPKの活性化が必須である。
MST1KDとともにRasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKKを導入したFH2細胞を200ng/ml抗Fas抗体で刺激して4時間後に細胞質を抽出した。MKP-1を同時に導入すると、RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKKのCaspase抑制効果が無効になった。切断されたMST1KDの上のバンドは非特異的なバンドである。



図3-12 活性型RalGDSはCaspaseの活性化を抑制しない。
左図はMST1KDとMYR-RalGDSをともにFH2細胞に導入し、200ng/ml抗Fas抗体で刺激して4時間後に細胞質を抽出した。右図はMYR-RalGDSの発現を確認した。

ないことが示された。

一方、H-Ras による PI-3 キナーゼ経路の活性化が Akt/PKB の活性化を通じて、Fas の発現レベルを低下させ抗 Fas 刺激に対する抵抗性を獲得するという報告がなされている (Peli et al., 1999)。そこで我々は、FH2 細胞において K-Ras による抗 Fas 刺激に対する抵抗性獲得における PI-3 キナーゼ経路の影響についてさらに検討するために、PI-3 キナーゼのサブユニットの優勢阻害型変異である $\Delta p85$ (Sakaue et al., 1995; Rodriguez-Viciano et al., 1997) を K-Ras とともに細胞に導入する実験をおこなった。K-RasV12 によって Akt のリン酸化が亢進したが、 $\Delta p85$ との共発現によって Akt のリン酸化が抑制されていることを確認した (図 3-10)。この $\Delta p85$ が K-RasV12 と共発現している場合でも、K-RasV12 による Fas を介するアポトーシス抑制活性は阻害されなかった (図 3-4)。同様に Caspase の活性化も抑制されていた (図 3-7)。さらに、活性型 Akt の発現によっても、抗 Fas 刺激後の細胞の生存率の変化は見られなかった (図 3-4、3-9)。以上のことから FH2 細胞における Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制には、MAPK 経路の活性化が必須であることが示された。

Ras/MAPK による Fas を介するアポトーシスの抑制はどのようにおこなわれているのかを明らかにしていくために、まず Ras/MAPK によって Fas の発現が抑えられている可能性について検討をおこなった。具体的には、細胞に遺伝子とともに GFP 発現ベクターを導入し、GFP を発現している細胞における Fas の発現をフローサイトメーターをもちいて解析した。FH2 細胞ではヒト β -アクチンプロモーターによって Fas を発現させているので、高い Fas の発現がみられる (図 3-13)。コントロールにおいて GFP の発現が低い細胞と比較して、GFP の発現が高い細胞においても Fas の発現レベルに差はみられなかった (図 3-14)。コントロールと同様に K-RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK を導入した細胞においても GFP の発現が高い細胞と低い細胞との間での Fas の発現の差は観察されなかった (図 3-14)。したがって、FH2 細胞における Ras による Fas を介

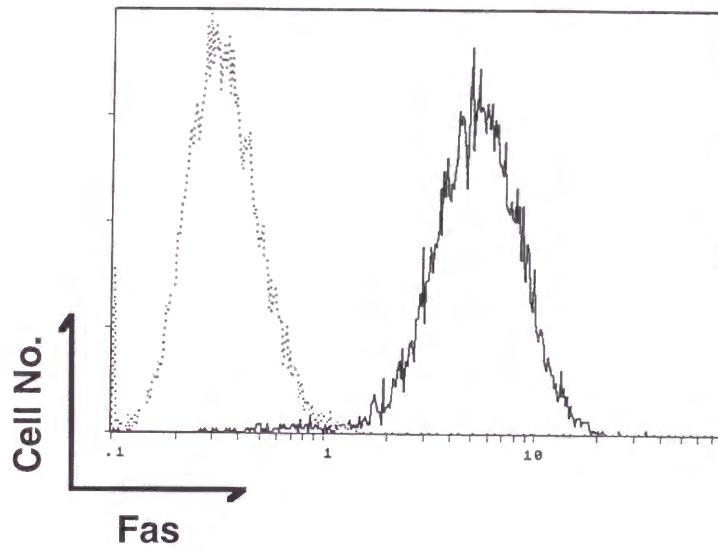


図3-13 FH2細胞のFasの発現量

FH2細胞をPE蛍光標識したコントロール抗体（点線）あるいは抗マウスFas抗体（Jo-2）で染色し、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。

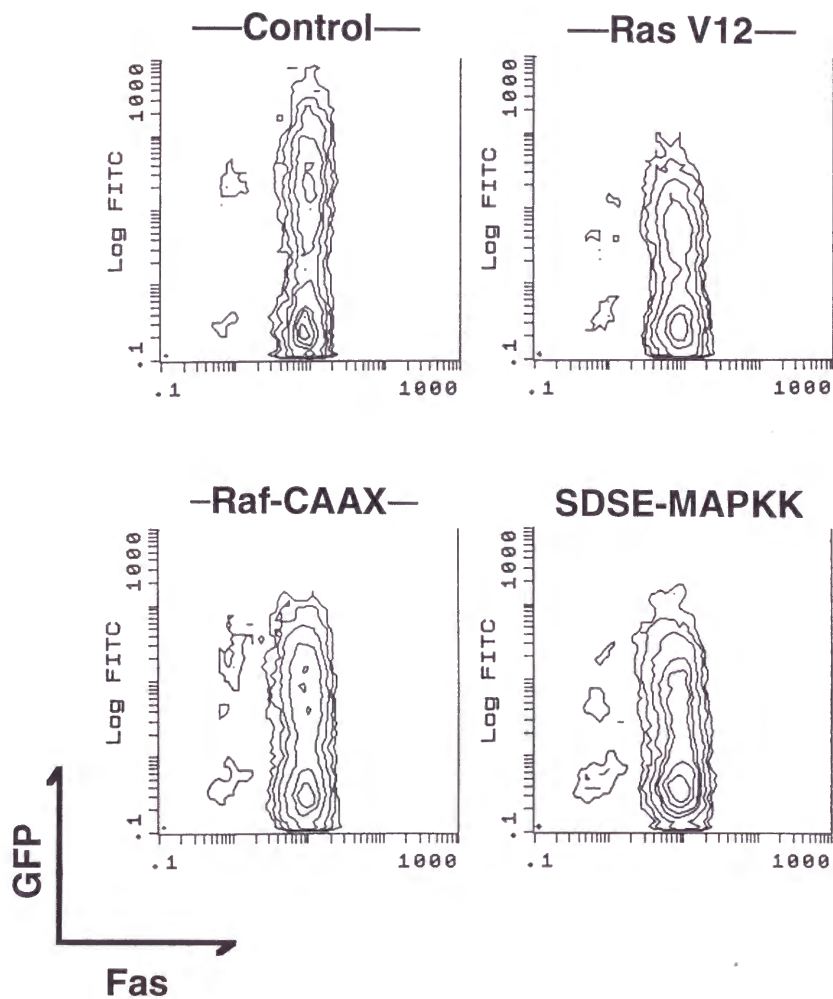


図3-14 遺伝子導入したFH2細胞のFasの発現量

FH2細胞にGFPの発現ベクターとともに図示した遺伝子を導入し、フローサイトメーターをもちいて、GFPとPEの蛍光強度を測定した。縦軸がGFP蛍光強度を、横軸がPE蛍光強度（Fasの発現量）を示す。

するアポトーシスの抑制においては、Fas の発現低下が原因でないことが示された。さらに FH2 細胞の親株細胞である Balb3T3 細胞において K-RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK あるいは活性型 Akt によって、endogenous な Fas の発現が変化するののかも検討をおこなった。その結果、Balb3T3 細胞において K-RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK 発現による Fas の発現レベルの変化は観察されなかった（図 3-15）。以上の結果から、K-Ras による MAPK 経路の活性化では Fas の発現は低下しないことが明らかとなった。

3-5 bFGF 前処理による Fas を介するアポトーシスの抑制

ここまでは活性型遺伝子の高発現による Ras/MAPK 経路の活性化からえられた実験結果を示した。この場合、高発現による artifact による特殊な条件下での結果を観察している可能性があった。そこでより生理状態に近い条件での MAPK の活性化によって、Fas を介するアポトーシスが抑制されるかどうか検討を行った。FH2 細胞を EGF、IGF、bFGF といった Ras を活性化できる増殖因子で前処理を施した後、抗 Fas 刺激を与え、アミドブラックで生細胞を染色し洗浄後にタンパクと結合したアミドブラックの量を吸光光度計によって測定することで、細胞の Fas 誘導アポトーシスへの感受性の変化を定量化した（図 3-16）。その結果、EGF や IGF 処理した細胞は無処理のコントロール細胞と同様の感受性を示し、抗 Fas 刺激後 4 時間で急激に細胞が浮遊したが、bFGF で処理した細胞では抗 Fas 刺激後 4 時間では浮遊細胞はほとんど観察されず、6 時間以降徐々に細胞が浮遊してきた。このとき、実際にアポトーシスが抑制されていたことを示すため、Caspase の特異的蛍光基質である蛍光テトラペプチド Ac-DEVD-MCA および Ac-IETD-MCA をもちいて Caspase の活性を調べた。Ac-DEVD-MCA および Ac-IETD-MCA はそれぞれ caspase-8/6 および Caspase-3/7 によって特異的に切断され、励起光をあてると蛍光を発するようになる。その蛍光量を測定することで、Caspase の活性を相対的に測定した。コントロールの

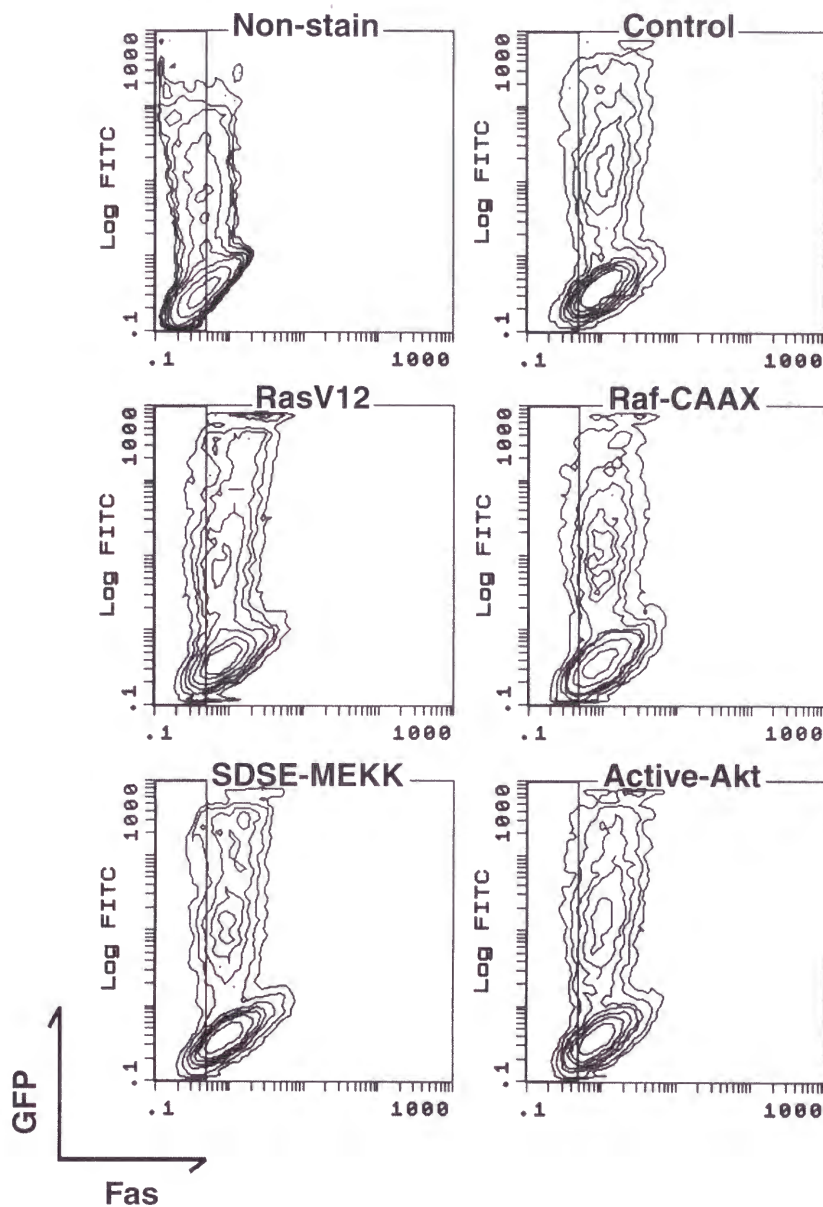


図3-15 Balb3T3におけるFasの発現量

内因性Fasの発現量の変化を観察するために、Balb3T3をもちいて図3-14と同様の実験を行った。縦軸がGFP蛍光強度を、横軸がPE蛍光強度（Fasの発現量）を示す。

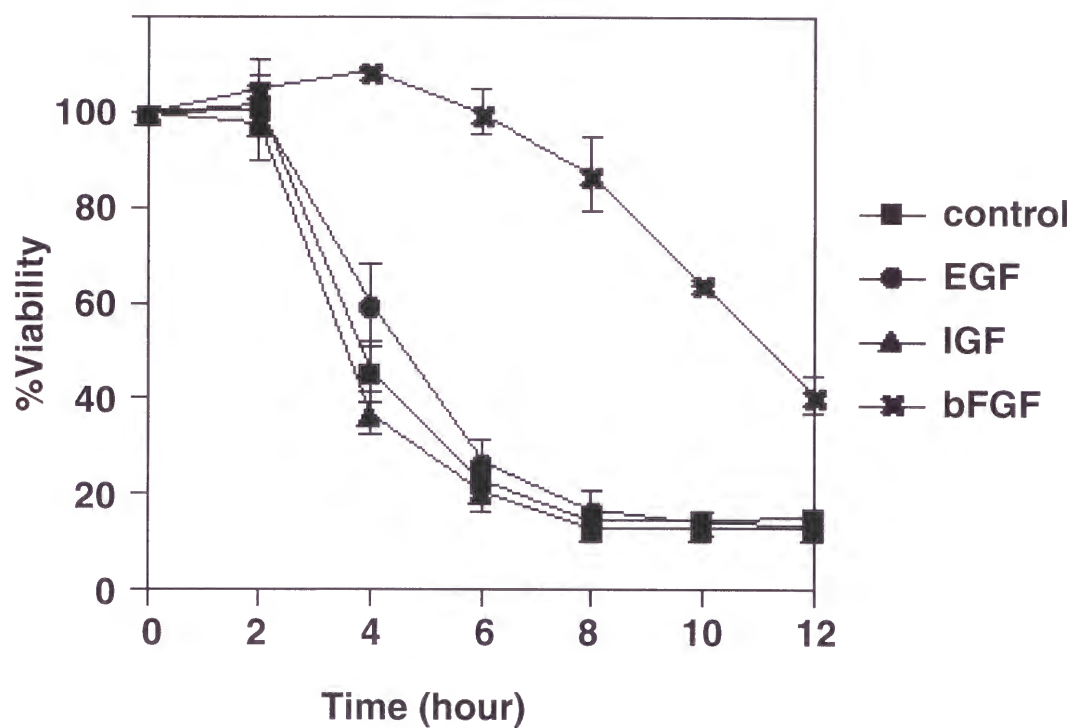


図3-16 増殖因子処理による抗Fas刺激に対する感受性変化
 FH2細胞をそれぞれ100ng/ml EGF、100ng/ml IGF、10ng/ml bFGFで16時間処理し
 200ng/ml抗Fas抗体で刺激した。各時間での細胞の生存率は、培養プレートに
 付着している生細胞をアミドブラック染色し、この色素の吸光度を測定すること
 で測定した。

細胞では、抗 Fas 刺激後 1 時間から 2 時間にかけて Caspase-8/6 (図 3-17) および Caspase-3/7 (図 3-18) のどちらも蛍光度が上昇したことから、ともに活性化していることが示された。しかし、bFGF 処理を施した細胞では、caspase-8/6 (図 3-17) の活性化はほとんど抑えられ、Caspase-3/7 (図 3-18) の活性化も抑制されていた。このことから、bFGF 処理した FH2 細胞においても、RasV12 の強制発現にみられたように、Caspase が活性化する前の段階での制御によって、アポトーシスを抑制していることが示された。しかし、bFGF 処理をおこなった細胞も 12 時間抗 Fas 刺激を続けると半数以上の細胞が浮遊しており (図 3-16)、さらに Caspase-3/7 が、刺激後 3 時間以降緩やかに活性化していた (図 3-18)。このことから、bFGF による生理的な Ras/MAPK 経路の活性化では、完全に抗 Fas 刺激によるアポトーシスを抑制できないことが示された。

3-6 bFGF による Fas を介するアポトーシスの抑制も Ras/MAPK の活性化を必要とする

続いて bFGF による Fas を介するアポトーシスの抑制が Ras/MAPK 経路の活性化によるのかどうかを調べるため、RasN17、MKP-1、 $\Delta p85$ の遺伝子を導入した FH2 細胞を bFGF で処理した後、抗 Fas 刺激に対する感受性がどう変化するか観察した。コントロールとしてベクターのみを導入した細胞では、bFGF 処理によって抗 Fas 刺激に対する感受性の低下が観察され、bFGF のアポトーシス抑制効果が観察された。また、 $\Delta p85$ を導入した細胞でもコントロールと同様に bFGF 処理後のアポトーシス抑制効果は観察された (図 3-19)。しかし、RasN17 および MKP-1 を導入した細胞では、bFGF 処理によるアポトーシス抑制効果が阻害された (図 3-19)。この結果から、bFGF による Fas を介するアポトーシスの抑制にも Ras/MAPK 経路の活性化が必須であり、PI-3 キナーゼの活性化は関与していないことが示された。

では、bFGF と同じく MAPK を活性化できる EGF では、なぜ Fas によるアポ

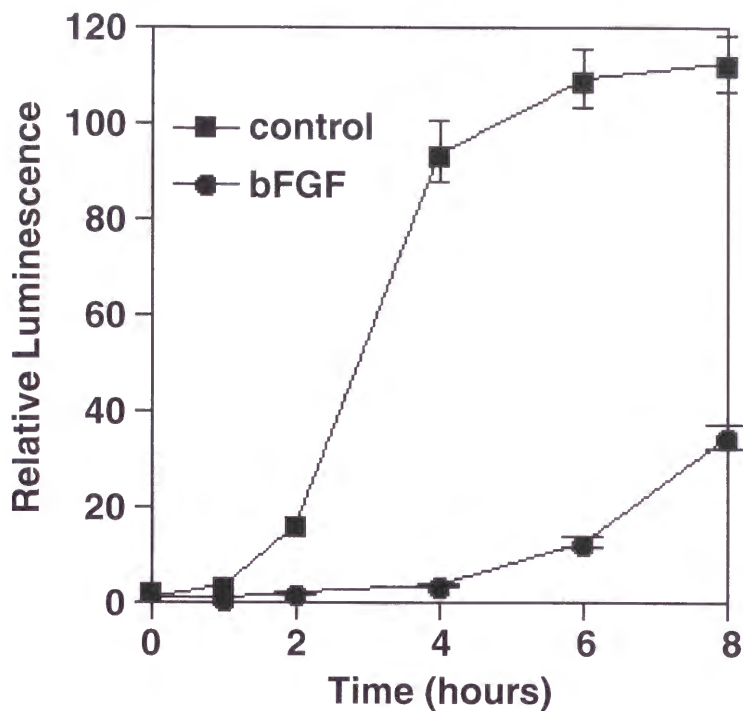


図3-17 IETD切断活性 (Caspase-8/6の活性化)
bFGF処理したFH2細胞を抗Fas刺激し各時間に細胞質を抽出し、抽出液中のIETD-MCAを切断する活性を、生成した蛍光物質AMCの相対蛍光強度を蛍光分光光度計をもちいて測定した。励起光360nm、検出蛍光480nm。

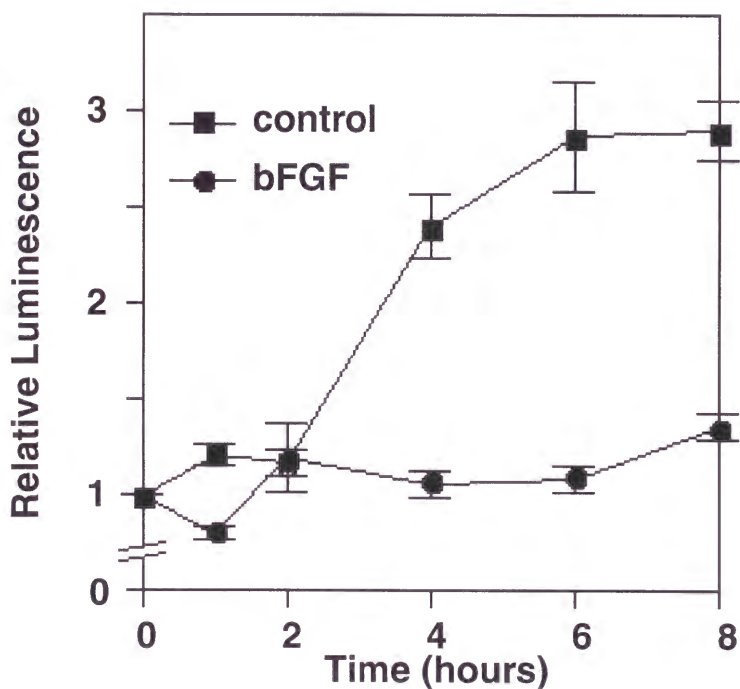


図3-18 DEVD切断活性 (Caspase-3/7の活性化)
DEVD-MCAをもちいて図3-17と同様の実験を行った。

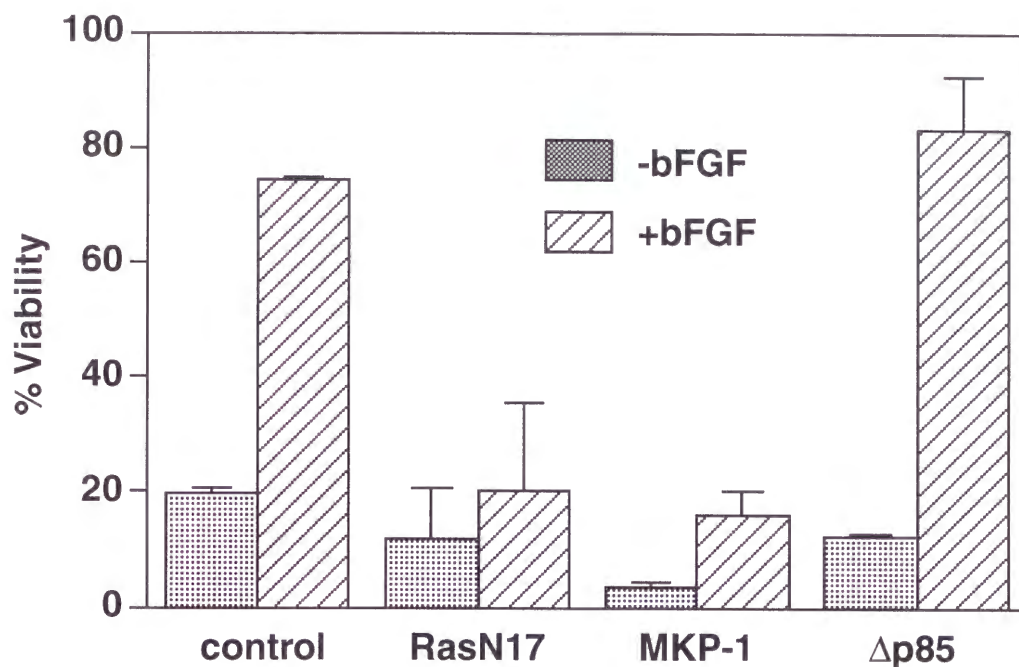


図3-19 bFGFはRas/MAPK経路を活性化してFasによるアポトーシスを抑制する
RasN17、MKP-1、Δp85をLacZとともに導入し、bFGFで16時間処理したFH2細胞
を200ng/mlの抗Fas抗体で4時間刺激した。生き残った細胞を固定し、X-Gal染色
して刺激前と刺激後でLacZポジティブの細胞数を比較した。

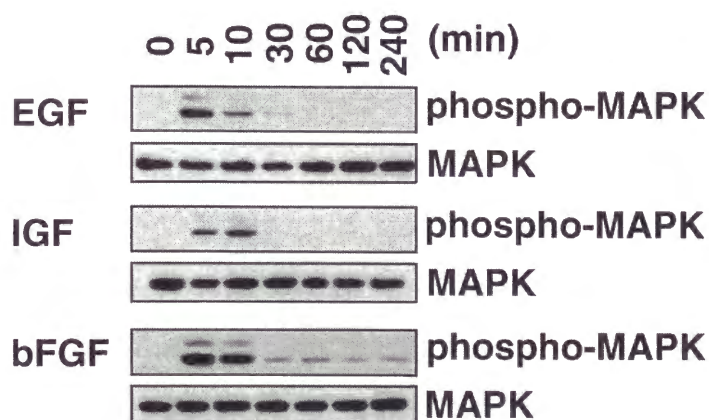


図3-20 増殖因子によるMAPKの活性化の Timecourse
FH2細胞を100ng/ml EGF、100ng/ml IGF、10ng/ml bFGFで処理し、各時間ごとに
細胞質を抽出し、これを解析した。

トーシスが抑制されないのだろう。この問題を解決するため、FH2 細胞において増殖因子刺激により MAPK がリン酸化されている状態を実際確認した（図 3-20）。IGF 処理では弱くしか MAPK はリン酸化されなかったが、どの増殖因子においても処理後 5 分から 10 分でリン酸化された MAPK の量が最大となった。そして、EGF および IGF 処理した細胞では、処理後 1 時間以内にリン酸化された MAPK の量は刺激前のレベルにまで下がり、バンドが確認できなくなってしまった（図 3-20）。一方、bFGF 処理した細胞では処理後 1 時間以降も、ある程度の MAPK がリン酸化された状態が維持されていた（図 3-20）。このことから、生理的な MAPK の活性化によって Fas を介するアポトーシスを抑制するには、MAPK を持続的に活性化しておくことが必要のよう考えられる。

3-7 bFGF 刺激では内因性 Fas の発現はかわらない

bFGF 処理によっても Fas を介するアポトーシスの抑制に Ras/MAPK 経路の活性化が必要であることが示されたが、bFGF で処理した親株の Balb3T3 細胞と FH2 細胞において内因性 Fas の発現が減少しているのかをフローサイトメーターをもちいて調べた。Balb3T3 細胞においても FH2 細胞においても、bFGF 処理前と処理後での Fas の発現に変化は見られなかった（図 3-21）。このことから、Ras/MAPK 経路の活性化による bFGF による Fas を介するアポトーシスの抑制には Fas の発現制御でない、別の機構が関わっていることが示された。

3-8 c-FLIP による Fas を介するアポトーシスの制御

c-FLIP はその発現によって Fas を介するアポトーシスを抑制することが報告されており (Irmeler et al., 1997)、リンパ球細胞において活性化にともなう抗 Fas 刺激への感受性が低くなるのは MAPKK の活性化を必要とする c-FLIP の発現上昇が原因であるという報告がある (Yeh et al., 1998)。そこで FH2 細胞における c-FLIP の発現をノザンハイブリダイゼーションによって検出をこころみた。

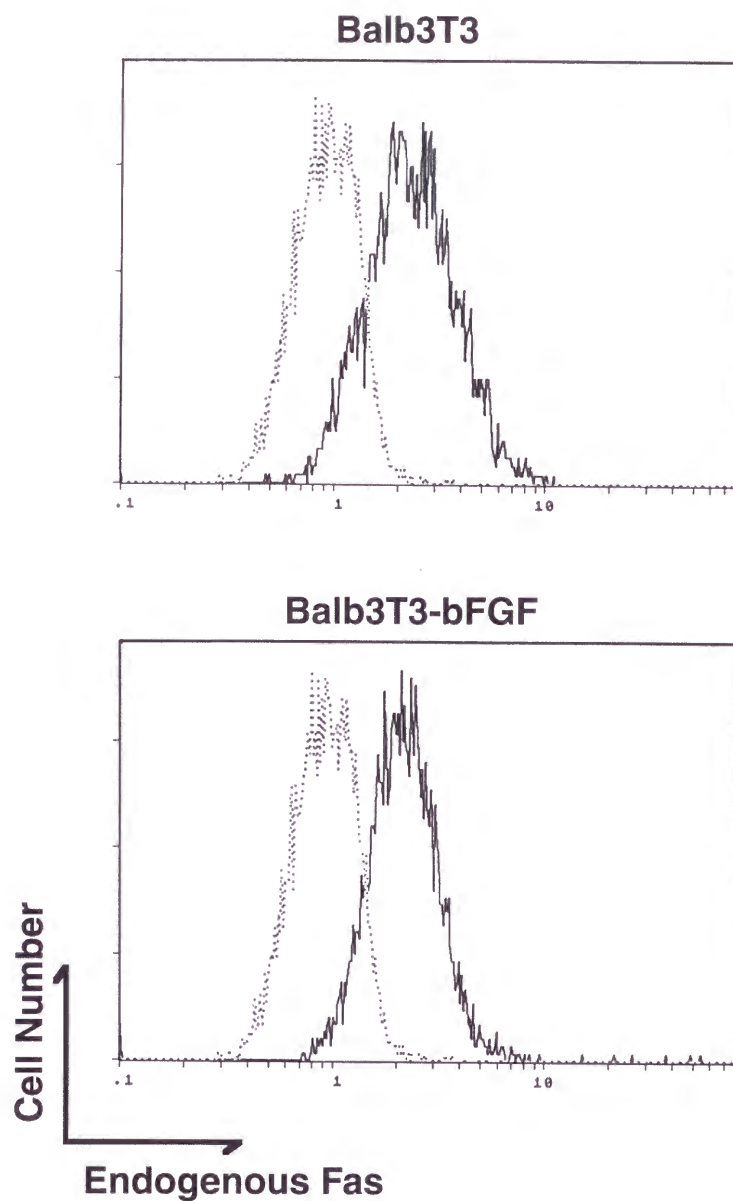


図3-21 bFGF処理したBalb3T3細胞におけるFasの発現量
Balb3T3を用いて、無処理の細胞（上図）とbFGF処理した細胞（下図）とをPE標識した抗Fas抗体PE-Jo2（実線）とコントロール抗体（点線）で染色し、フローサイトメーターで蛍光強度を解析した。

しかし、Caspase-8 が十分検出できるトータル RNA 量 (30 μ g) を用いても、無処理の細胞と bFGF 処理した細胞のどちらからも c-FLIP の mRNA は検出できなかった。このことは、FH2 細胞における c-FLIP の発現量が Caspase-8 と比べて極端に低いことを示している。そこで我々はマウス c-FLIP に対する特異的プライマーをもちいた Reverse Transcriptional (RT) -PCR をおこなうことで c-FLIP の mRNA の検出をこころみた。まず、用いたプライマーの特異性を確認するために EF1 α と c-FLIP の遺伝子を組み込んだベクターでの PCR とマウスリンパ球系細胞 L5178Y から採取したトータル RNA もちいた RT-PCR をおこなった。ベクターに組み込まれた遺伝子をもちいたときに検出された DNA のバンドと同じ泳動度のバンドが、L5178Y 細胞のトータル RNA をもちいた場合にも観察された (図 3-22)。次に無処理の FH2 細胞と bFGF 処理した FH2 細胞から採取したトータル RNA 2 μ g をもちいて RT-PCR をおこなった。マウス EF1 α 特異的プライマーをもちいておこなったコントロール RT-PCR では、各増幅サイクルで同じように増幅されたバンドが検出されたことから、RT-PCR にもちいた RNA 量が bFGF 処理と無処理のどちらのサンプルでも全く等しいことが示唆された (図 3-23)。次いで c-FLIP 特異的プライマーをもちいて RT-PCR をおこなった結果、bFGF 処理した細胞の RNA をもちいた場合には、無処理の細胞の RNA をもちいた場合に比べて c-FLIP 特異的バンドが 1 サイクル早く検出された (図 3-23)。これは c-FLIP の mRNA がおよそ 2 倍増えたことを示唆しているが、EF1 α の増幅サイクルと比較するとおよそ 7 サイクル遅れてバンドが検出され、さらに特異的に増幅された DNA 量も非常に少なかった。

3-9 ヒト癌細胞由来細胞株における Ras の効果

ヒトの癌細胞由来細胞株である HeLa 細胞と KB 細胞の Fas 導入細胞株を用いて、抗 Fas 刺激によって誘導されるアポトーシスに対する RasV12 の抑制効果と RasN17 の促進効果の検討をおこなった。結果は、RasV12 を導入した細胞

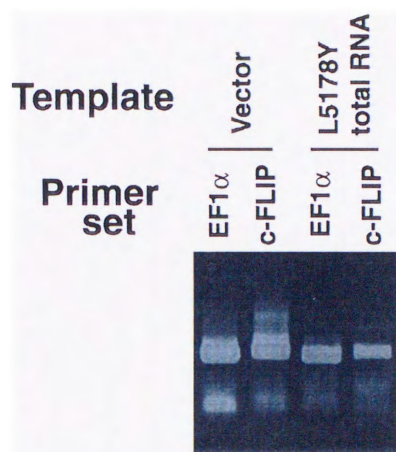


図3-22 PCRプライマーチェック (ポジティブコントロール実験)
 EF1 α とc-FLIPのプライマーのセットを用いてベクターに組み込まれた遺伝子の増幅を通常のPCR法で行った (Vector)。また、マウスT細胞由来の細胞株 L5178Y から精製した総RNAをもちいて、RT-PCRを行った (L5178Y total RNA)。それぞれのプライマーセットで、総RNAをもちいてもプライマー特異的バンドの増幅が確認された。

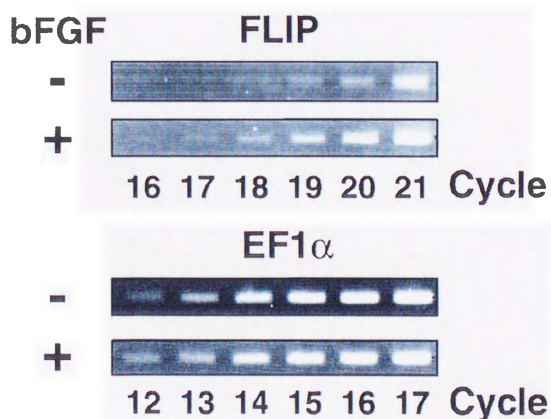


図3-23 RT-PCRによるc-FLIP mRNAの相対的量比
 無処理のbFGF処理した細胞から総RNAを精製し、2 μ gのRNAをもちいて RT-PCRを行い、サイクルごとに反応産物を取り出し、2%アガロースでの電気泳動によってPCR産物を検出した。

と RasN17 を導入した細胞のどちらもコントロールと同様の細胞生存率を示した（図 3-24）。同様に MKP-1 を導入したが抗 Fas 刺激に対する感受性に変化はなかった（図 3-24）。したがって、すでにトランスフォームしている HeLa 細胞と KB 細胞においては抗 Fas 刺激によるアポトーシス誘導に対して MAPK の活性制御による感受性の変化は観察されなかった。

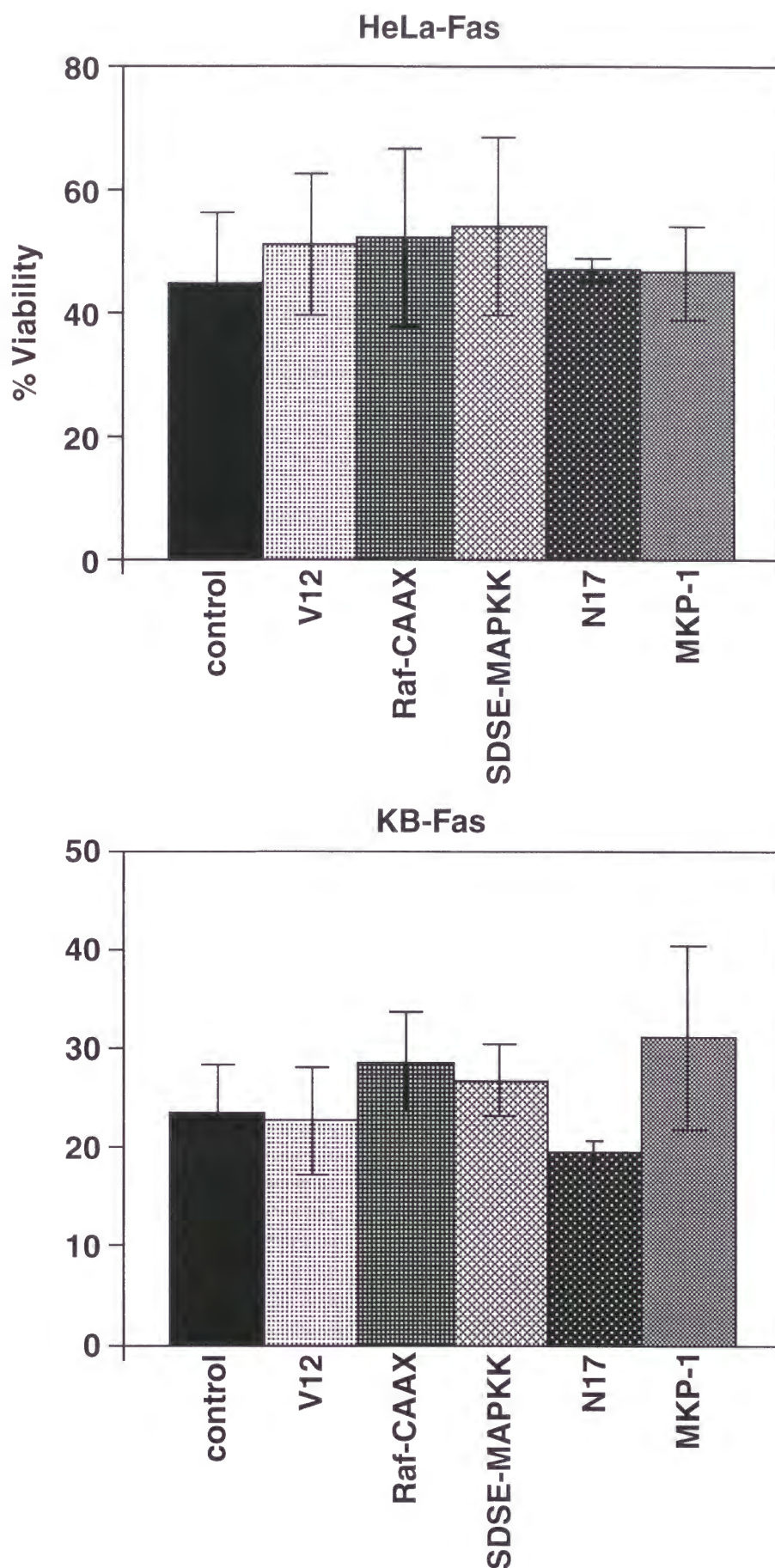


図3-24 ヒト癌細胞由来細胞株におけるFasを介するアポトーシスへの遺伝子効果
 HeLa-Fas、KB-Fasともに外来性のFasを安定に高発現している細胞株である。LacZ
 とともに遺伝子導入後、抗Fas刺激（500ng/ml CH-11で8時間）を与え細胞をX-Gal染色
 して細胞の生存率を測定した。

第4章 考察

我々は、発現クローニング法によって Fas を安定に発現させた Balb3T3 細胞において、原癌遺伝子である c-K-Ras の一過性発現によって、Fas を介するアポトーシスが抑制されることを発見した。変異型 Ras を用いた実験系から Ras の活性型変異が MAPK を活性化させることによって Fas によるアポトーシスを抑制すること、さらに阻害型変異がアポトーシスを促進することを示した。活性型 Ras を一過性に発現させた場合、抗 Fas 刺激に対する感受性は著しく低下し抵抗性を示したが、8 時間におよぶ持続的な抗 Fas 刺激によって細胞の生存率の低下が観察された（図 3-3I）。しかし、持続的な抗 Fas 刺激後に生存している細胞を観察すると、細胞骨格の著しい発達をともなう形態変化が起きている細胞が主に生き残っていた（図 3-3I and J）。Ras の活性化が細胞骨格の再構成および発達に寄与していることを考えると、この結果はトランスフォームしていない Balb3T3 細胞において、活性型 Ras の発現量が多いほど、抗 Fas 刺激に対して抵抗性を獲得することを示している。したがって、腫瘍化しつつある細胞における Ras の活性化は、その活性化の程度が著しいほど Fas によるアポトーシスに対して抵抗性を獲得することを示唆している。このことは細胞が腫瘍化するとき、細胞傷害性 T 細胞が Fas-Fas リガンドを用いて腫瘍細胞を除去する機構（Rouvier et al., 1993, Suda et al., 1993, Kojima et al., 1994）から逃れ、腫瘍の悪性化へのステップに深く関わっているとも考えられる。

部分的機能欠損変異 Ras を用いた実験においては、K-RasV12 と比較してアポトーシス抑制活性は弱かったが、K-RasS35 と K-RasG37 のどちらも Fas を介するアポトーシスを抑制した（図 3-4）。RasS35 は Raf を特異的に活性化し、RasG37 は RalGDS を特異的に活性化すると報告されている（Kauffmann-Zeh et al., 1997）。しかしながら、RasV12 と優勢阻害型 Ral（RalN28）をともに発現させても、Ras のアポトーシス抑制活性は阻害されなかったうえ、活性型 RasGDS

(myr-RalGDS) を発現させた場合でもアポトーシスは抑制されなかった。したがって、RalGDS 経路は FH2 細胞において Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制には関与していないと結論づけた。また、ある種の細胞においては増殖因子除去によって誘導されるアポトーシスが PI-3 キナーゼの活性化を通じた Akt の活性化によって抑制されることから、Fas によるアポトーシスも PI-3 キナーゼ/Akt 経路の活性化によって抑制されるのではないかと考えられた。しかし、PI-3 キナーゼを特異的に活性化すると報告されている RasC40 を発現させても Fas によるアポトーシスは抑制されなかった (図 3-4)。さらには、Ras による PI-3 キナーゼの活性化を抑制する $\Delta p85$ を RasV12 とともに発現させて Akt のリン酸化を阻害しても (図 3-10) RasV12 のアポトーシス抑制効果は阻害されなかったことと (図 3-7)、活性型 Akt を発現させても FH2 細胞においては Fas によるアポトーシスが抑制されなかったこと (図 3-7) を合わせて考えると、PI-3 キナーゼ/Akt 経路の活性化では、増殖因子除去のときに誘導されるアポトーシスと異なり、Fas によって誘導されるアポトーシスを抑制することはできないことが示された。一方、Ras によって活性化されるシグナル伝達経路であるクラシカルな MAPK(ERK)経路を不活性化するフォスファターゼである MKP-1 を RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK とともに細胞に導入するとこれらの活性型遺伝子のアポトーシス抑制効果を著しく阻害することから (図 3-7)、Ras による Fas を介するアポトーシスの抑制にはクラシカルな MAPK の活性化が必要であることが示された。これらのことから増殖因子除去によるアポトーシスの誘導と Fas によるアポトーシスの誘導は、異なった分子機構によって制御されていることが示された。

多細胞生物の細胞増殖は生体全体の調和を保つために厳密に制御されている。そのため、細胞が癌化するためには何重にもコントロールされた細胞増殖の制御機構が破壊される必要がある。そればかりではなく、細胞が異常増殖能を獲得することによってアポトーシスが誘導される。このことによって、細胞の癌

化が制御されている。このようなことを考えると、細胞の増殖能を高める Ras の活性化が同時に Fas を介するアポトーシスを正常に近い繊維芽細胞において抑制することは興味深い。また、癌細胞由来細胞株では、Balb/c マウス胎児繊維芽細胞由来の FH2 細胞と比較した場合、Fas を高発現させても抗 Fas 刺激に対する感受性が比較的低く、アポトーシスを起こして細胞が死ぬまでに時間がかかったり、死なない細胞が多数残ったりした。さらにトランスフォームした細胞株の中には、COS7 細胞のように Fas を高発現させて抗 Fas 刺激を与えてもアポトーシスが全く誘導されない細胞株も存在した。細胞の癌化と Fas を介するアポトーシスの抑制は密接に関係していると予想できた。一方、我々はヒトの癌由来の細胞株である HeLa 細胞と KB 細胞における RasV12 と RasN17 の効果を検討したが、これらの細胞株では RasV12 のアポトーシス抑制効果も RasN17 のアポトーシス促進効果も観察されなかった (図 3-24)。さらに、MKP-1 を導入してもアポトーシス促進効果も観察されなかった (図 3-24)。これらのことは、癌化した細胞内では MAPK が活性化されていない状態になっても、抗 Fas 刺激に対して耐性となる形質を解除できないことを示しており、FH2 細胞にみられたような MAPK の活性制御による抗 Fas 刺激に対する感受性調節が行えない状態にあることを示している。つまり、細胞傷害性 T 細胞などによる Fas を介するアポトーシスによる腫瘍細胞除去機構から完全に免れているといえる。細胞の癌化は多段階変異によって引き起こされるとされているが、Fas を介するアポトーシス感受性の制御も Ras/MAPK を介する段階と、他の分子機構による段階から成立しているのかもしれない。

我々は、FH2 細胞において bFGF 処理が Ras/MAPK の活性化を介して Fas によるアポトーシスを抑制することを示した (図 3-19)。一方、別のグループからはヒトの正常メラニン細胞に対して bFGF を処理すると、トランスフォームした細胞のように振る舞うという報告がなされた (Nesbit et al., 1999)。FH2 細胞においても bFGF 処理した場合、細胞増殖の接触阻害能は保たれていたもの

の、もともと扁平な細胞が細長くなり盛り上がった形態に変化したことから、bFGF 処理によって、完全ではないにしろトランスフォーメーションを模倣しているように見受けられた。これらのことから細胞が癌化していくための重要なステップでも、細胞の増殖能獲得、細胞の形態変化、アポトーシスの抑制という一見独立子垂用に見受けられる現象すべてにおいて、MAPK の活性化が関与している可能性が示唆された。

FH2 細胞においては、EGF や IGF での処理によっても MAPK が活性化されるが、これらの増殖因子による刺激では抗 Fas 刺激に対する感受性に変化はみられなかった。(図 3-16)。これらの増殖因子と bFGF で処理した場合の違いを解析した結果、MAPK をリン酸化して活性化している時間に差が認められた(図 3-20)。Marshall の review によると、好クローム性細胞腫(褐色細胞腫)由来細胞株 PC12 を EGF で処理した場合は細胞の増殖が観察されるが、FGF や NGF で刺激した場合では細胞は分裂を停止し神経様突起の伸長が観察されるという(Marshall, 1995)。これは PC12 細胞において EGF 刺激は増殖シグナルとなるが FGF や NGF 刺激は分化シグナルとしてはたらくことを示していると考えられる。増殖因子刺激に対する PC12 細胞の異なった反応の原因として、MAPK がリン酸化され活性化されている時間が重要であると考えられている(Marshall, 1995)。FH2 細胞においては、EGF や IGF による MAPK の活性化は一過性であったが、bFGF で刺激した場合 MAPK のリン酸化状態が長時間維持されていた。したがって、Fas を介するアポトーシスに対して抵抗性を獲得するには、単に増殖シグナルが入るだけでなく、分化やトランスフォームを促進するシグナルつまり MAPK を持続的に活性化するシグナルが入ることが重要であると考えられる。

Fambrough らは DNA チップ技術を用いて増殖因子によって発現誘導される遺伝子群を同定した(Fambrough et al., 1999)。その報告によると、PDGF や FGF で細胞を刺激すると Immediate Early Genes (IEGs)と名付けた一連の遺伝子群の

転写が促進されるが、EGF 刺激では PDGF や FGF で転写誘導される IEGs の一部の遺伝子だけの転写が促進されたという。これにより異なった増殖因子刺激による細胞応答の違いを遺伝子の転写制御レベルで説明することが可能になるかもしれない。さらに、PDGF や FGF で刺激した時に特異的に発現誘導される遺伝子群の中に Fas によるアポトーシスの抑制に関わる遺伝子が含まれている可能性も考えられるので、FH2 細胞においても EGF と bFGF で刺激した場合に発現が異なる遺伝子を探索することで、Fas によるアポトーシスを抑制する分子機構の解明につながることも考えられる。

繊維芽細胞と上皮細胞において癌遺伝子である H-RasV12 が PI-3 キナーゼの活性化を通じて Fas の発現を抑制するという報告が存在する (Peli et al., 1999)。そこで我々は、K-RasV12、Raf-CAAX、SDSE-MAPKK を FH2 細胞および親株の Balb3T3 細胞に導入し、Fas の発現量が変化するかどうか検討をおこなった。その結果、 β -アクチンプロモーター支配下に Fas を発現している FH2 細胞においても、内因性 Fas のみを発現する Balb3T3 細胞においても Fas の発現量に変化はみられなかった (図 3-14、3-15)。さらに、bFGF で刺激した場合においても、Fas の発現量に変化は観察されなかった (図 3-21)。これらの結果から、Ras/MAPK 経路の活性化による Fas を介するアポトーシスの抑制は、Fas の発現量を低下させることによるのではなく、細胞内における何らかの調節機構によって抑制されていることが示唆された。しかも Balb3T3 細胞において、活性型 Akt を導入した実験を行っても Peli らが報告したような Fas の発現低下は観察されなかった。我々と Peli らの実験結果の相違は、もちいた細胞や遺伝子の発現システムが異なっていることによるのかもしれない。さらに最近、H-Ras、K-Ras、N-Ras でそれぞれ活性化するシグナル経路に志向性があり機能的にも異なっていることが報告されたが (Voice et al., 1999)、Peli らは H-Ras を用い、我々は K-Ras をもちいたことが、我々の実験で Fas の発現低下が観察されなかった一つの理由なのかも知れない。

我々は、刺激していない細胞と bFGF で刺激した細胞から RNA を精製し、c-FLIP に対するノザンハイブリダイゼーションを行った。コントロールの EF1 α と Caspase-8 の mRNA が検出できる条件で、c-FLIP の mRNA はノザンハイブリダイゼーションでは検知できなかった。この結果は、FH2 細胞における c-FLIP の発現が Caspase-8 と比較してかなり低いことを示している。そこでさらに感度のいい RT-PCR での検出を試みたが、FH2 細胞の RNA をもちいた c-FLIP 特異的 DNA の検出は EF1 α と比較して PCR のサイクルを多く必要とし、しかも増幅された DNA のバンドの検出も感度を高くする必要があった。したがって、FH2 細胞における c-FLIP の発現量は非常に少ないと考えられる。しかし、bFGF 刺激後の細胞から RNA を調製してくると、およそ 1 サイクル早く増幅された c-FLIP のバンドが検出されるので、bFGF 処理によって mRNA 量が 2 倍程度増えたことを示している。c-FLIP の発現量が低いので Ras/MAPK によって Fas 誘導アポトーシスの抑制に c-FLIP 関与する可能性は低いと予想しているが、c-FLIP が Ras/MAPK の活性化による Fas のアポトーシス抑制にはらたいているかどうかをさらに検討する必要があると考えている。

ここではトランスフォームしていない繊維芽細胞を用いることで、Ras/MAPK 経路の活性化が Fas を介するアポトーシスに対して抑制的にはたらき、細胞が癌化していくステップに寄与している可能性を示すことができた。今後、その抑制機構の解明を目指していきたい。また、これと同じ分子機構が免疫系の T 細胞および B 細胞が抗原刺激後、Fas 刺激に対して耐性となる機構に関わっていないかどうか検討していきたい。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、御指導下さった米原伸先生に深くお礼を申し上げます。また、本研究を進める上において欠くことのできない遺伝子及び細胞を分与していただいた西田栄介先生、永田和宏先生、梅園和彦先生、小川渉先生、吉川潮先生、J.F. Hancock、R. Roth、L. A. Feig に感謝の気持ちを新めるとともに貴重な研究材料を分与していただいたことに関して科学者としての姿勢を学ばさせられました。当研究室においては李慶權さん、村川正男君らの作成したMST1-KD のベクターを使わせていただいたこと、ここに改めて感謝いたします。また、酒巻和宏先生、村上昭先生には多くの助言をいただいたこと、多方面にわたり研究生活を支えお世話してくださった京都大学ウイルス研究所生体発がん機構部門のみなさまに感謝の気持ちを申しあげます。

最後に、多くの心配と苦勞をともにしてくれた妻である有実と我が子奎志に心から感謝しこの論文を捧げます。

参考文献

- Adams, J. M., and Cory, S. 1998. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
- Adrain, C., E.A. Slee, M.T. Harte, and S.J. Martin. 1999. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *J Biol Chem.* 274:20855-20860.
- Aschkenazi, A., and Dixit V.A., 1999. Apoptosis control by decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:255-260.
- Bergmann, A., J. Agapite, K. McCall, and H. Steller. 1998. The *Drosophila* gene hid is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling. *Cell.* 95:331-341.
- Boldin, M.P., T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev, and D. Wallach. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 85:803-815.
- Boldin, M.P., E.E. Varfolomeev, Z. Pancer, I.L. Mett, J.H. Camonis, and D. Wallach. 1995. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270:7795-7798.
- Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V.M. Dixit. 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 81:505-512.

de Craen, M.V., W. Declercq, I.V. den Brande, W. Fiers, and P. Vandenabeele. 1999. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* 6:1117-1124.

Deveraux, Q.L., N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsedale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, and J.C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J.* 17:2215-2223.

Downward, J. 1998. Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:49-54.

Dudek, H., S.R. Datta, T.F. Franke, M.J. Birnbaum, R. Yao, G.M. Cooper, R.A. Segal, D.R. Kaplan, and M.E. Greenberg. 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science.* 275:661-665.

Earnshaw, W.C., L.M. Martins, and S.H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 68:383-424.

Fambrough, D., K. McClure, A. Kazlauskas, and E.S. Lander. 1999. Diverse signaling pathways activated by growth factor receptors induce broadly overlapping, rather than independent, sets of genes. *Cell.* 97:727-741.

Fernandes-Alnemri, T., R.C. Armstrong, J. Krebs, S.M. Srinivasula, L. Wang, F. Bullrich, L.C. Fritz, J.A. Trapani, K.J. Tomaselli, G. Litwack, and E.S. Alnemri. 1996. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine

protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:7464-7469.

Fenton, R.G., J.A. Hixon, P.W. Wright, A.D. Brooks, and T.J. Sayers. 1998. Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras. *Cancer Res*. 58:3391-3400.

Fukuda, M., Y. Gotoh, and E. Nishida. 1997. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J*. 16:1901-1908.

Gibson, S., S. Tu, R. Oyer, S.M. Anderson, and G.L. Johnson. 1999. Epidermal growth factor protects epithelial cells against Fas-induced apoptosis. Requirement for Akt activation. *J. Biol. Chem*. 274:17612-17618.

Gunning, P., J. Leavitt, G. Muscat, S.Y. Ng, and L. Kedes. 1987. A human beta-actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:4831-4835.

Hirata, H., A. Takahashi, S. Kobayashi, S. Yonehara, H. Sawai, T. Okazaki, K. Yamamoto, and M. Sasada. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*. 187:587-600.

Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 388:190-195.

Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata. 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*. 66:233-243.

Kang, J.J., M.D. Schaber, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G. Litwack, D.J. Hall, and M.A. Bjornsti. 1999. Cascades of mammalian caspase activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 274:3189-3198.

Kauffmann-Zeh, A., P. Rodriguez-Viciana, E. Ulrich, C. Gilbert, P. Coffey, J. Downward, and G. Evan. 1997. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*. 385:544-548.

Kennedy, S.G., A.J. Wagner, S.D. Conzen, J. Jordan, A. Bellacosa, P.N. Tsichlis, and N. Hay. 1997. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev*. 11:701-713.

Khwaja, A., P. Rodriguez-Viciana, S. Wennstrom, P.H. Warne, and J. Downward. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J*. 16:2783-2793.

Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 14:5579-5588.

Klas, C., K.M. Debatin, R.R. Jonker, and P.H. Krammer. 1993. Activation interferes

with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol.* 5:625-630.

Kohn, A.D., F. Takeuchi and R.A. Roth. 1996. Akt, a pleckstrin homology domain containing kinase, is activated primarily by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 271: 21920-21926.

Kojima, H., N. Shinohara, S. Hanaoka, Y. Someya-Shirota, Y. Takagaki, H. Ohno, T. Saito, T. Katayama, H. Yagita, K. Okumura, and et al. 1994. Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity.* 1:357-364.

Kurada, P., and K. White. 1998. Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression. *Cell.* 95:319-329.

Lee, K.K., M. Murakawa, E. Nishida, S. Tsubuki, S. Kawashima, K. Sakamaki, and S. Yonehara. 1998. Proteolytic activation of MST/Krs, STE20-related protein kinase, by caspase during apoptosis. *Oncogene.* 16:3029-3037.

Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 88:323-331.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479-489.

Maeda, T., Y. Yamada, R. Moriuchi, K. Sugahara, K. Tsuruda, T. Joh, S. Atogami, K. Tsukasaki, M. Tomonaga, and S. Kamihira. 1999. Fas gene mutation in the progression

of adult T cell leukemia. *J. Exp. Med.* 189:1063-1071.

Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80:179-185.

Medema, J.P., C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J.* 16:2794-2804.

Morgenstern, J.P., and H. Land. 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* 18:3587-3596.

Muzio, M., A.M. Chinnaiyan, F.C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J.D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P.H. Krammer, M.E. Peter, and V.M. Dixit. 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell.* 85:817-827.

Muzio, M., G.S. Salvesen, and V.M. Dixit. 1997. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem.* 272:2952-2956.

Nagata, S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell.* 88:355-365.

Nishimura, Y., A. Ishii, Y. Kobayashi, Y. Yamasaki, and S. Yonehara. 1995. Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J. Immunol.* 154:4395-4403.

Owen-Schaub, L.B., S. Yonehara, W.L.d. Crump, and E.A. Grimm. 1992. DNA fragmentation and cell death is selectively triggered in activated human lymphocytes by Fas antigen engagement. *Cell Immunol.* 140:197-205.

Peli, J., M. Schroter, C. Rudaz, M. Hahne, C. Meyer, E. Reichmann, and J. Tschopp. 1999. Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J.* 18:1824-1831.

Peng, S.L., M.E. Robert, A.C. Hayday, and J. Craft. 1996. A tumor-suppressor function for Fas (CD95) revealed in T cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184:1149-1154.

Philpott, K.L., M.J. McCarthy, A. Klippel, and L.L. Rubin. 1997. Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J. Cell. Biol.* 139:809-815.

Rinkenberger, J.L., and S.J. Korsmeyer. 1997. Errors of homeostasis and deregulated apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:589-596.

Rodriguez-Viciano, P., P.H. Warne, A. Khwaja, B.M. Marte, D. Pappin, P. Das, M.D. Waterfield, A. Ridley, and J. Downward. 1997. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell.* 89:457-467.

Rothstein, T.L., J.K. Wang, D.J. Panka, L.C. Foote, Z. Wang, B. Stanger, H. Cui, S.T. Ju, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells. *Nature.* 374:163-165.

Rouvier, E., M.F. Luciani, and P. Golstein. 1993. Fas involvement in Ca^{2+} -independent T cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 177:195-200.

Sakamaki, K., I. Miyajima, T. Kitamura, and A. Miyajima. 1992. Critical cytoplasmic domains of the common beta subunit of the human GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors for growth signal transduction and tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 11:3541-3549.

Sakaue, H., K. Hara, T. Noguchi, T. Matozaki, K. Kotani, W. Ogawa, K. Yonezawa, M.D. Waterfield, and M. Kasuga. 1995. Ras-independent and wortmannin-sensitive activation of glycogen synthase by insulin in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 270:11304-11309.

Salvesen, G.S., and V.M. Dixit. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:10964-10967.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scaffidi, C., I. Schmitz, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 274:1541-1548.

Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green, and S.J. Martin. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9- dependent manner. *J Cell Biol.*

144:281-292.

Songyang, Z., D. Baltimore, L.C. Cantley, D.R. Kaplan, and T.F. Franke. 1997. Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:11345-11350.

Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, G. Litwack, and E.S. Alnemri. 1996a. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE- like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:14486-14491.

Srinivasula, S.M., T. Fernandes-Alnemri, J. Zangrilli, N. Robertson, R.C. Armstrong, L. Wang, J.A. Trapani, K.J. Tomaselli, G. Litwack, and E.S. Alnemri. 1996b. The Ced-3/interleukin 1beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem.* 271:27099-27106.

Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1:949-957.

Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science.* 267:1445-1449

Stennicke, H.R., J.M. Jurgensmeier, H. Shin, Q. Deveraux, B.B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H.M. Ellerby, L.M. Ellerby, D. Bredesen, D.R. Green, J.C. Reed, C.J. Froelich, and G.S. Salvesen. 1998. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J*

Biol Chem. 273:27084-27090.

Stokoe, D., S.G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons, and J.F. Hancock. 1994. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science*. 264:1463-1467.

Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, and S. Nagata. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 75:1169-1178.

Takahashi, A., H. Hirata, S. Yonehara, Y. Imai, K.K. Lee, R.W. Moyer, P.C. Turner, P.W. Mesner, T. Okazaki, H. Sawai, S. Kishi, K. Yamamoto, M. Okuma, and M. Sasada. 1997. Affinity labeling displays the stepwise activation of ICE-related proteases by Fas, staurosporine, and CrmA-sensitive caspase-8. *Oncogene*. 14:2741-2752.

Thornberry, N.A., and Y. Lazebnik. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281:1312-1316.

Van de Craen, M., P. Vandenabeele, W. Declercq, I. Van den Brande, G. Van Loo, F. Molemans, P. Schotte, W. Van Crielinge, R. Beyaert, and W. Fiers. 1997. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett*. 403:61-69.

Voice, J.K., R.L. Klemke, A. Le, and J.H. Jackson. 1999. Four human ras homologs differ in their abilities to activate raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *J. Biol. Chem*. 274:17164-17170.

Williams, G.T. 1991. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*. 65:1097-1098.

Xia, Z., M. Dickens, J. Raingeaud, R.J. Davis, and M.E. Greenberg. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270:1326-1331.

Yeh, J.H., S.C. Hsu, S.H. Han, and M.Z. Lai. 1998. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* 188:1795-1802.

Yin, C., C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, and T. Van Dyke. 1997. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*. 385:637-640.

Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara. 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169:1747-1756.

Zornig, M., A. Grzeschiczek, M.B. Kowalski, K.U. Hartmann, and T. Moroy. 1995. Loss of Fas/Apo-1 receptor accelerates lymphomagenesis in E mu L-MYC transgenic mice but not in animals infected with MoMuLV. *Oncogene*. 10:2397-2401.

風間 啓敬& 米原 伸、実験医学別冊「サイトカイン実験法」宮島篤、山本雅 編、pp74-81、1997、羊土社。